Aus dem Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt
Münster i.Westfalen
Direktor: Oberregierungsveterinärrat Dr. A. K ö s e r

---

# Überlebensraten von Mycoplasma gallinarum bei Gefriertrocknung

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
I n g e F l i r geb.Polzin
Tierärztin aus Berlin

---

Berlin 1962

Journal-Nr. 392

**W. WEHMEIER KG**

Technische Fotografie Klein-Offsetdruck

Berlin 65 Pankstr 28-30 Tel 46 89 28

Aus dem Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt
Münster i.Westfalen
Direktor: Oberregierungsveterinärrat Dr. A. K ö s e r

---

# Überlebensraten von Mycoplasma gallinarum bei Gefriertrocknung

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
I n g e  F l i r geb.Polzin
Tierärztin aus Berlin

---

Berlin 1962

Journal-Nr. 392

Gedruckt mit Genehmigung der
Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof.Dr.H.J.Heidrich
Referent: Prof.Dr.H.Hartwigk
Korreferent: Prof.Dr.F.Ulbrich

Tag der mündlichen Prüfung:
19.XII.1962

Meiner Mutter in Dankbarkeit gewidmet

# Inhaltsverzeichnis


I. Einleitung

II. Literatur

A. Die Gefriertrocknung
1. Trocknung und Gefriertrocknung von Bakterien
2. Die Schutzlösung
3. Das Einfrieren und Trocknen
4. Die Restfeuchtigkeit
5. Die Lagerung

B. Pleuropneumonieähnliche Organismen - PPLO -
1. Vorkommen, Definition und Systematik der PPLO
2. Morphologie
3. Züchtung der PPLO
   a) Nährböden, Zusatz von Bakteriostatika
   b) Stammhaltung
   c) PPLO und die L-Phase von Bakterien
4. Widerstandsfähigkeit der PPLO gegen physikalische Faktoren
5. Nachweis der PPLO

III. Eigene Untersuchungen

A. Material

B. Methodik und Versuchsergebnisse
1. Einfluß verschiedener Schutzmedien auf die Überlebensrate
2. Einfluß der Einfriertemperaturen und -methoden ($-20^{\circ}C$ und $-70^{\circ}C$, Langsam- bzw. Schnellmethode) auf die Überlebensrate
3. Einfluß des Trocknungsvorganges
4. Überlebensrate nach viermonatiger Lagerung unter Vakuum bei $+ 4^{\circ}C$ und $+ 20^{\circ}C$
5. Stichprobenuntersuchungen auf Restfeuchtigkeit (RF) bei lyophil getrockneten Mycoplasmen

C. Besprechung der Ergebnisse

D. Zusammenfassung

IV. Literaturverzeichnis

V. Lebenslauf

## I. Einleitung

Unter den Krankheiten des Geflügels haben im letzten Jahrzehnt die Erkrankungen des Respirationsapparates eine besondere Bedeutung gewonnen. Die Intensivhaltung und die dabei häufig ungünstigen Haltungsbedingungen, wie Überbesetzung der Ställe, ungenügende oder nicht zugfreie Ent- und Belüftung und eine damit einhergehende zu hohe Luftfeuchtigkeit, führen bei Küken wie auch bei erwachsenen Hühnern zu Erkältungs- und schnupfenartigen Erkrankungen.

Eine der wirtschaftlich verlustreichsten Herdenerkrankungen der Hühner und Puten aus dem Komplex der Erkrankungen des Respirationsapparates ist heute die in der englischen und amerikanischen Literatur als CRD (Chronic Respiratory Disease) bezeichnete chronische Erkrankung der Atmungswege (Chu und Newham 1959). Sie wird durch pleuropneumonieähnliche Erreger (PPLO) hervorgerufen, eine Bakteriengruppe, die mit Nelsons coccobacillären Körperchen identisch ist. Diese Krankheit bereitet bezüglich einer exakten Diagnose große Schwierigkeiten und ist therapeutisch schwer zu beeinflussen.

Das ausländische Schrifttum über die PPLO ist kaum noch zu übersehen und bringt eine Fülle von Namen für die Mikroorganismen. Sie werden nach der z.Zt. gültigen Einteilung zu der Ordnung Mycoplasmatales Freundt (42) und der Gattung Mycoplasma gezählt.

Im Rahmen der Forschungsarbeiten über die Aetiologie der infektiösen Erkrankungen der oberen Luftwege des Huhnes und ihr Vorkommen im Einzugsgebiet des Staatlichen Veterinäruntersuchungsamtes Münster in Westfalen wurde mir die Aufgabe gestellt, den Einfluß der Gefriertrocknung auf Mycoplasmen bei Verwendung verschiedener Schutzlösungen, Einfriertemperaturen und Lagerungstemperaturen zu untersuchen.

Vor allen Dingen sollte den Untersuchungen über die Überlebensrate sofort nach der Gefriertrocknung und nach viermonatiger Lagerung bei verschiedenen Temperaturen besondere Beachtung geschenkt werden, um eine geeignete Methode zur Konservierung der Mikroorganismen über einen längeren Zeitraum mit geringem Arbeits- und Kostenaufwand zur Hand zu haben.

Bakterien, die mit Hilfe der Gefriertrocknung konserviert werden, verändern ihre Eigenschaften nicht und können über Jahre hinweg lebend aufbewahrt werden. Die Bakterienzelle hat die Eigenschaft, unter dem Einfluß des Wasserentzuges in ein Stadium latenten Lebens überzugehen, indem sie, dem Zustand der Spore vergleichbar, schädigenden Umwelteinflüssen eine gesteigerte Widerstandskraft entgegensetzt. Um quantitativ hohe Ausbeuten, d.h. Überlebensraten, zu erhalten, sind folgende Faktoren von Bedeutung:

a) die Schutzlösung
b) die Einfriermethode
c) die Trocknung (Restfeuchtigkeit)
d) die Lagerungsbedingungen

Fünf der im Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt isolierten und geprüften 464 Mycoplasmenstämme bildeten das Material für meine Untersuchungen. Für die gleichzeitig durchgeführten Kontrolluntersuchungen wurde mir der Mycoplasmenstamm PPLO X 95 zur Verfügung gestellt. Dieser Stamm wurde dem Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt freundlicherweise von Herrn Dr. R i c h t e r, Boxmeer/Holland, lyophilgetrocknet überlassen.

# II. Literatur

## A. Die Gefriertrocknung

### 1. Trocknung und Gefriertrocknung von Bakterien

Das Prinzip der Trocknung als geeignetes Verfahren zur Konservierung von Bakterien über längere Zeiträume unter Erhaltung ihrer charakteristischen Eigenschaften hat eine weite Verbreitung gefunden. Die Überführung von Bakterien durch Trocknung in eine für lange Zeit haltbare Dauerform geschieht in größerem Maßstab täglich in der unbeeinflußten Natur. Das allgemein verbreitete Verfahren, Mikroben in kürzeren oder längeren Abständen auf frische Nährböden zu bringen, um sie am Leben zu erhalten, befriedigt wenig, ist von einer Virulenzabnahme der Keime begleitet, kostspielig und zeitraubend.

Die Methode der Trocknung von Bakterien unter Lufteinwirkung und im Exsikkator prüften H e i m und F i c k e r (10,4,5) an einer Vielzahl von Keimen. Übereinstimmend wurde festgestellt, daß die Überlebensrate von Bakterien bei Trocknung im Exsikkator höher liegt als in nicht völlig trockener Luft. Die Geschwindigkeit des Trocknens erwies sich als wichtiger Faktor für die Konservierung lebender Bakterien. F i c k e r trocknete Choleravibrionen und Typhus- sowie Pestbakterien im Exsikkator über $CaCl_2$. Wichtig war auch die Keimdichte der Ausgangskultur und der mitgetrocknete Nährboden. Nach F i c k e r (4,5) umgibt der Nährboden die Keime als schützende Hülle. H e i m (10) trocknete Mikroben ebenfalls im Exsikkator über $CaCl_2$. Er verwendete an Seidenfäden mittels Blut angetrocknete Pneumo-

kokken. Der Verfasser stellte eine Trocknungsbeständigkeit von 1 1/3 Jahren fest; dabei blieb die Virulenz voll erhalten.

Weiter vervollkommnet wurde das Verfahren der Trocknung durch B r o w n (1) und Ot t e n (13), die zur Vakuumexsikkatortrocknung übergingen. B r o w n trocknete im partiell evakuierten Exsikkator über $CaCl_2$ Streptokokken, Pneumokokken und Corynebakterien. Seine Präparate zeichneten sich durch eine hohe Haltbarkeit aus. O t t e n (13) trocknete im Vakuumexsikkator über konzentrierter $H_2SO_4$ und lagerte seine Präparate in evakuierten Glasampullen. Er trocknete viele Mikrobenarten, auch Gonokokken, Meningokokken und Choleravibrionen mit guten Überlebensraten aus der flüssigen Phase. Die Trocknung dieser empfindlichen Keime gelang ihm sogar bei einfacher Aufschwemmung der Keime in destilliertem Wasser. Dabei dienten wahrscheinlich die Eiweißstoffe der abgestorbenen Bakterien als Schutzkolloide. O t t e n erzielte im Laufe seiner Untersuchungen gute Überlebensraten, wenn er den zu trocknenden Kulturen abgetötete Bakterienaufschwemmung hinzufügte.

Die G e f r i e r t r o c k n u n g hat als sehr schonendes Verfahren zur Konservierung biogenen Materials in vielen Gebieten der Biologie, der Medizin und der Pharmazeutik Verbreitung gefunden. Die physikalische Grundlage der Gefriertrocknung ist der Wasserentzug aus gefrorenem Material durch Sublimation im Vakuum. Sehr wichtige Anwendungsgebiete sind die Gefriertrocknung von Blutbestandteilen und anderen flüssigen Eiweißpräparaten (Trockenplasma hat fast unbegrenzte Haltbarkeit). Auch Arzneimittel, Antibiotika, Bakterien- oder Viruskulturen, Vakzine und Gewebsstücke eignen sich gut für die Gefriertrocknung. (N e u m a n n (11).

Die erste unumstrittene Anwendung einwandfreier Gefriertrocknung stammt von dem Leipziger Anatomen A l t m a n n (1890). Er trocknete Organstückchen über Schwefelsäure bei einer Tem-

eratur von -20°C im Vakuum und begründete damit die Ge-
riertrocknung von Gewebsstückchen zu histologischen Zwecken,
t.nach V o s s (20).

t a m p (18) verglich die Methode der Vakuumexsikkator-
rocknung mit der Methode der Gefriertrocknung und führte
uantitative Untersuchungen über die Überlebensrate durch.
s Trockengut wurde unter Vakuum bei Zimmertemperatur aufbe-
ahrt. Unter anderen wurden Salmonellen, Pasteurella pestis,
rysipelothrix rhusiopathiae, Streptococcus pyogenes, Vibrio
holerae und Brucella melitensis getrocknet und 4 Jahre auf-
ewahrt. Der hohe Prozentsatz der überlebenden Bakterien nach
Jahren läßt nach Ansicht des Verfassers die Wahrscheinlich-
eit des Überlebens auch für eine längere Zeit annehmen. Die
irulenz wurde in getrocknetem Zustand zufriedenstellend er-
alten. Vergleiche der Überlebensraten von Chromobacterium
rodigiosum bei Trocknung im Exsikkator und nach Gefriertrock-
ung zeigten günstigere Ergebnisse bei der ersten Methode. Von
ergleichenden Untersuchungen über Trocknung und Gefriertrock-
ung berichteten in neuester Zeit S c h m i d t, F e l d m a n n,
o b b e r s t e i n (15) und F e l d m a n n (3). Sie un-
ersuchten 100 Bakterienstämme, darunter empfindliche Meningo-,
ono- und Pneumokokkenstämme. Getrocknet wurde am freihängen-
en Rechen bei Zimmertemperatur unter Verwendung einer Gas-
allastpumpe. Alle 100 Stämme überlebten die einfache Trock-
ung sowie die Gefriertrocknung. Nach 1/2-jähriger Lagerung
Glasampullen unter Vakuum bei Zimmertemperatur war nur ein
amm bei beiden Trocknungsverfahren abgestorben. Die einfach
trockneten Stämme hatten durchweg eine höhere Überlebensra-
als die gefriergetrockneten Kulturen. Nach beiden Trock-
ngsverfahren und nach 1/2-jähriger Lagerung wurde niemals
ne Änderung der vor dem Trocknen geprüften biologischen Ei-
nschaften festgestellt. Auf Grund ihrer günstigen Erfahrun-
n empfehlen die Verfasser die einfache Trocknung aus der
üssigen Phase.

S h a c k e l l, zit. nach E l s e r (2), beschreibt 1909 das Trocknen geringer Mengen von eingefrorenem Material. Die Kühllösung war ein Salz-Eisgemisch; getrocknet wurde im evakuierten Exsikkator über $P_2O_5$ zur Wasserabsorption. Anschließend wurden die Ampullen unter Vakuum abgeschmolzen. Die Aktivität des biologischen Materials blieb voll erhalten. Nach dem Shackellschen Prinzip konservierte H a m m e r (9) Mikroorganismen. S w i f t (19) modifizierte die Shackellsche Methode. Er trocknete im gefrorenen Zustand, d.h. das Material wurde während der Trocknungsphase im gefrorenen Zustand gehalten. S w i f t trocknete u.a. Streptokokken und Pneumokokken und stellte überlebende Keime noch nach 2-4 Jahren fest. Die getrockneten Mikroben behielten ihre kulturellen, biochemischen und immunologischen Eigenschaften.

Neue Gefriertrocknungssysteme entwickelten E l s e r, T h o m a s und S t e f f e n (2). Sie trockneten Antisera und Antigene, Bakterien und Hefen mit gutem Erfolg. Die Mikroorganismen büßten nach Aufbewahrung unter Vakuum keine ihrer biologischen Eigenschaften ein. Die Verfasser trockneten das Material an einem Trockenrechen mit mehreren Anschlüssen. Chemikalien und Kühlmittel, kombiniert mit einem hohen Vakuum, wurden zur Ableitung des verdunstenden Wassers während des Trocknungsprozesses benutzt.

In der Folgezeit berichteten viele Autoren über Erfolge bei der Gefriertrocknung mit verschiedenen Gefriertrocknungssystemen: O e l f k e n, S c h m i d t, H ö r t e r, S c h e i b n (12,16,7,8,14).

Die modernen Gefriertrocknungsanlagen arbeiten mit durch Thermostate gesteuerten Kühl- und Heizsystemen und Vakuumpumpen, die ein Hochvakuum von weniger als $1 \times 10^{-3}$ Torr erzeugen können. Der Wasserdampf wird entweder durch Gasballastpumpen direkt abgesaugt, oder in Kompressorkühlfallen abgefroren. Nach beendeter Trocknung werden die Ampullen unter Vakuum zuge -

schmolzen. Man kann bei diesen Anlagen den Einfrier- und Trocknungsprozeß den jeweiligen Gegebenheiten des Materials anpassen.

Die Schutzlösung

Die Erhaltung der Lebensfähigkeit von Bakterien- und Virusstämmen über lange Zeiträume hinweg mit Hilfe der Gefriertrocknung erfordert optimale Bedingungen für das Einfrieren und Trocknen. Übereinstimmend haben alle Autoren, die sich mit dieser Methode der Konservierung befaßten, die wichtige Rolle der Schutzlösung hervorgehoben. Es wird berichtet, daß eiweißreiche Medien wie Serum, Milch und Bouillon die Widerstandsfähigkeit der Bakterien erhöhen, während wässrige Lösungen die Überlebensrate herabsetzen.

F i c k e r (4,5) betont die Verwendung der geeigneten Schutzlösung als wichtigen Faktor für die erfolgreiche Konservierung. Er beobachtete, daß eiweißhaltige Medien die Lebensfähigkeit der Bakterien bewahren. F i c k e r überprüfte weiter die Wirkung von NaCl, physiologischer NaCl-Lösung und Aqua-dest. als Schutzlösung für Choleravibrionen. NaCl und auch physiologische NaCl-Lösung wirkten in hohem Grade bakterizid. Während Bouillon nahezu die Werte der Ausgangskeimzahl ergab, war NaCl der Bouillon 10.000-fach unterlegen. Fünf Tropfen Bouillon zu 25 $cm^3$ NaCl schwächten die schädigende Wirkung ab. Destilliertes Wasser wirkte in hohem Grade schädigend. Die Konzentrationsänderung rief anscheinend osmotische Druckänderungen hervor, die der Zellmembran abträglich waren. Durch den Hinzutritt von Wasser quollen nach Ansicht des Verfassers die Eiweiße in den Zellen auf, und dabei verließen wichtige Salze die Zelle. Weiter überprüfte F i c k e r die Eignung von Urin, Milch, Serum und Speichel als Schutzlösung. Milch zeigte die günstigsten Ergebnisse, dann folgten Serum und Bouillon. Urin hatte, augenscheinlich wegen der gelösten Salze, eine ähnlich ungünstige Wirkung wie NaCl. Der Verfasser hält es für günstiger, die entsprechenden Bakterien nicht in ihrem Nährmedium, son-

dern in einer gut geeigneten Schutzlösung zu trocknen.

Gute Überlebensraten erzielte O t t e n (13), wenn er den zu trocknenden Kulturen Aufschwemmungen abgetöteter Bakterien als Schutzkolloide zufügte. Bouillon oder Nährgelatine als Schutzmedium benutzten F r y und G r e a v e s (6) neben anderen proteinhaltigen Lösungen mit gutem Erfolg. Sie berichteten, daß die Zugabe von 5 - 10% Glukose zur Schutzlösung die Überlebensrate ansteigen ließ. F r y nimmt an, daß die Glukose automatisch geringe Wassermengen, die für das Überleben nötig sind, zurückhält. Laktose hatte denselben Effekt.

Neben der Wahl der Schutzlösung ist das Alter der Kultur und die Konzentration der Bakterienzellen in der Schutzlösung sehr wichtig. F r y empfiehlt eine spezielle Schutzlösung für die Gefriertrocknung: ein Teil Nährbouillon, drei Teile Serum + 7,5 Glukose. Auch nach 1 Jahr Lagerung der Kulturen ergaben sich zufriedenstellende Werte bei Überprüfung der Überlebensrate.

S c h m i d t, F e l d m a n n und D o b b e r s t e i n (15), S c h e i b n e r (14), benutzten mit gutem Erfolg Magermilch. H ö r t e r (7,8) trocknete seine Kulturen in Magermilch + 7,5% Glukose und Mixtura desiccans nach F r y mit zufriedenstellendem Ergebnis. S c h m i d t (16) konnte durch vergleichende Untersuchungen nicht feststellen, daß e i n e der benutzten Schutzlösungen (10% Rinderserum/Aqua dest., Magermilch + 7,5% Glukose/Aqua dest. und 0,9% NaCl/Aqua dest. ) bei a l l e n überprüften Bakterienarten und Lagerungsbedingungen bessere Ergebnisse hatte. Serum und Magermilch erwiesen sich im Gegensatz zu NaCl klar überlegen. Die entscheidende Rolle der Schutzkolloide wird auch von V o s s (20) betont. Er sieht in ihnen schützende Hüllen, die geringe lebensnotwendige Wassermengen zurückhalten.

Das Einfrieren und Trocknen

Vor dem eigentlichen Einfrieren werden die Bakterien eine Zeitlang der Einwirkung einer meist kolloidalen Schutzlösung ausgesetzt. Die wichtigsten Modifikationen des Einfrierens von Bakteriensuspensionen sind:

a) extrem langsames Einfrieren.
   Der Entzug der Wärme erfolgt langsam, die Temperatur des Trockengutes sinkt um $1^{o}$ - $0{,}5^{o}C$ pro Minute ab.

b) extrem schnelles Einfrieren.
   Hierbei wird das Trockengut in Sekunden auf tiefe Temperaturen abgekühlt.

Für die Konservierung der Lebensfähigkeit von Bakterien und Viren ist von L u y e t und Mitarbeitern, zit. nach N e u m a n n (11), extrem schnelles Einfrieren als günstiger bezeichnet worden. Erfahrungen von N e u m a n n, H ö r t e r, F e l d m a n n (11,7,8,3) bestätigten diese Ansicht allerdings nicht. Sie erreichten günstigere Überlebensraten bei Verwendung der Methode des langsamen Einfrierens. H ö r t e r (7,8) prüfte an 32 Bakterienstämmen den Einfluß der Einfriergeschwindigkeit auf die Überlebensrate. Der Gesamtdurchschnitt aller Überlebensraten betrug bei langsamem Einfrieren 60,87%, nach schnellem Einfrieren nur 47,8%. Alle Keime vertrugen das langsame Einfrieren besser. Bei Verwendung von Mixtura desiccans nach F r y an Stelle von Magermilch war die schnelle Einfriermethode bei Brucella abortus überlegen. H ö r t e r empfiehlt daher, das Einfrierverfahren auf Keimart und Schutzlösung abzustimmen.

Sehr wichtig ist für das Einfrieren die Berücksichtigung des eutektischen Punktes der Schutzlösung. Der eutektische Punkt ist die tiefstmögliche Gefrierpunkterniedigung einer Salzlösung; das Eutektikum verschiedener Gemische ist oft tiefer als das einer Einzelkomponente. Wird eine salzhaltige Lösung über ihrem eutektischen Punkt eingefroren, so erstarrt nur das Wasser,

während die Salzkonzentration steigt. In organischen kolloidalen Lösungen, wie den Schutzlösungen, findet man immer Spuren von verschiedenen Salzen. Man muß darum bei möglichst tiefen Temperaturen einfrieren, die das Eutektikum hinreichend berücksichtigen. Beim Wiederauftauen gefrorenen Bakterienmaterials wächst mit steigender Temperatur die Größe der Eiskristalle rasch an. Dadurch treten mechanische Zerstörungen der Zellen und Ionenverschiebungen auf. Versuche mit schneller und langsamer Temperatursteigerung zeigten, daß das schnelle Auflösen des Eises (im Wasserbad bei 37°C) bessere Ergebnisse bringt. V o s s (20).

Verschiedene Autoren stellten fest, daß es fürdie Bakterien eine kritische Temperatur gibt. H a i n e s, zit. nach S c h m i d t (16), fror Pseudomonas aeruginosa bei verschiedenen Temperaturen ein und stellte fest, daß Temperaturen unter -20°C die Überlebensrate der Bakterien deutlich erhöhten. V o s s (20) lyophilisierte mehrere Diphtheriestämme und Shig.flexneri bei abfallenden Temperaturen: -20°C, -40°C und -60°C und fand bei -40°C die günstigste Überlebensrate.

Das Einfrieren wird zweckmäßigerweise so vorgenommen, daß die anschließende Trocknungszeit möglichst kurz gehalten werden kann. Dazu muß die Oberfläche des Trockengutes so groß wie möglich, die Schichtdicke aber möglichst gering sein. Es werden 4 Möglichkeiten zum Einfrieren flüssiger Präparate in einer Kühllösung beschrieben:

a) Das senkrechte Einfrieren bietet die ungünstigsten Verhältnisse. Es ist nur bei geringen Mengen von Trocknungsgut zu empfehlen. Die Bakteriensuspension gefriert dann in Form eines kleinen Blockes von wenigen mm Dicke.

b) Beim schrägen Einfrieren werden die Ampullen etwas geneigt, damit das Trockengut eine größere Oberfläche bildet.

c) Zum flachen Einfrieren werden die Ampullen auf die Seite gelegt und das Trocknungsmaterial wird waagerecht eingefroren.

d) Am häufigsten wird die Methode des Einfrierens in Schalenform verwendet. Die Ampullen werden bis zum Erstarren des Trockengutes in Form eines Hohlzylinders an der Ampullenwand in der Kühllösung gedreht (Shell-Freezing).

Als Kühlmittel für den Einfrierprozeß werden $CO_2$-Eismischungen beschrieben. S w i f t (19) benutzte bei seinen ersten Versuchen ein Eis-Salzgemisch. Die meisten Autoren berichten von Kühllösungen aus Alkohol-$CO_2$-Schnee bzw. Aceton-$CO_2$-Mischungen, S c h m i d t, H ö r t e r, S c h e i b n e r (16,7,14).

Ein wesentlicher Faktor für einen optimalen Trocknungseffekt ist die schnelle Abführung des Wasserdampfes. Das Wasser wird unter Vakuum aus dem Eis des gefrorenen Materials zu Wasserdampf sublimiert. Der Partialdruck von Wasserdampf über dem gefrorenen Material hängt von der Temperatur des zu trocknenden Materials ab. Fällt die Temperatur, sinkt der Wasserdampfdruck. Bei steigender Temperatur nimmt er zu. Für eine optimale Trocknung ist darum eine Temperatur erforderlich, die nicht zu niedrig ist, um die Trocknung nicht extrem zu verlängern. Andererseits darf sie nicht zu hoch liegen, um die biologischen Substanzen nicht zu schädigen. Bei Vakuumtrocknung einer größeren Menge gefrorenen Materials kann die Temperatur durch die Verdunstungskälte erheblich absinken (pro g verdampften Eises ca. 680 cal. Wärmeverlust). In diesem Falle müßte das Trockengut vorsichtig bis nahe an die Grenze der kritischen Temperatur für das jeweilige Trockengut aufgeheizt werden. Die Verdunstungskälte reicht jedoch oft nicht aus, wenn in Ampullen bei Zimmertemperatur getrocknet wird. Hier muß dann eine Kühllösung verwendet werden, um den eutektischen Punkt des jeweiligen Materials berücksichtigen zu können. Die erste Phase der Trocknung, die Haupttrocknung, ist beendet, wenn die Temperatur im Trockengut ansteigt und der Druck in der Trockenkammer sinkt. Makroskopisch ist dann in den Ampullen kein Eis mehr festzustellen (n. H ö r t e r nach 18 - 20 Stunden).
An diese erste Phase schließt sich die sogenannte Nachtrocknung

an. Sie erfolgt bei Zimmertemperatur, ohne daß die Qualität des Trockengutes darunter leidet, N e u m a n n (11).

Die Entfernung des Wasserdampfes ist durch 3 Methoden möglich:

a) durch direktes Abpumpen,
b) durch Kondensation des Wasserdampfes an Flächen, die tiefer als das Trockengut gekühlt sind (Kompressorkühlfallen bei modernen Anlagen),
c) durch Absorption des Wasserdampfes an hygroskopischen Mitteln.

Verwendet werden an hygroskopischen Substanzen $CaCl_2$, $P_2O_5$, $H_2SO_4$ (H e i m, F i c k e r, S w i f t, S t a m p (10, 4, 5, 19, 18).

Um zu verhindern, daß das außerordentlich hygroskopische Trokkengut Feuchtigkeit aus der Luft an sich reißt und um oxydative Veränderungen zu vermeiden, werden die Ampullen unter Vakuum abgeschmolzen. Vorher werden die Trockenkammern mit steriler und trockener Luft geflutet.

4. Die Restfeuchtigkeit (RF)

Der Trockenheitsgrad, bis zu dem die Trocknung fortgesetzt wird, ist für die Lagerungsstabilität der gefriergetrockneten Bakterien von großer Bedeutung. Auf den Einfluß dieser sog. Restfeuchtigkeit (RF) weisen verschiedene Autoren hin. Untersuchungen über den Einfluß der Restfeuchtigkeit auf die Überlebensrate von Bakterien wurden von F r y und G r e a v e (6) durchgeführt. Sie stellten fest, daß die Zugabe von 5-10% Glukose oder Laktose zur Schutzlösung die Überlebensrate ansteigen ließ. Diese Beobachtung wurde sofort nach Trocknung des Materials und auch nach Lagerung der Ampullen gemacht. Bei länger andauerndem Trocknen ohne Glukose sank die Lebendkeimzahl auffallend ab. Die Vermutungen der Verfasser über die Funktion der Glukose und Laktose sind bei der Besprechung der Schutzlösung erwähnt worden. Optimale Restfeuchtigkeiten sind

z.Zt. noch nicht festgelegt. S c h e i b n e r (14) lyophilisierte Brucellen und Salmonellen und stellte grundsätzlich fest, daß die Lagerungsstabilität eine Funktion der Restfeuchtigkeit ist. Die geringsten Lagerungsverluste bei Brucellen traten bei einer RF von 5,2% auf. Der Lebendkeimverlust stieg bis zu 2% RF nur unwesentlich. Er wurde aber maximal, sobald 2% unterschritten wurden. Die Salmonellen verhielten sich ähnlich. Sie erwiesen sich gegen geringere RF-Werte jedoch als nicht so empfindlich.

Die Lagerung

Nach dem Abschmelzen der Ampullen unter Vakuum ist für die erfolgreiche Lagerung mit zufriedenstellendem Lebendkeimgehalt eine günstige Lagerungstemperatur erforderlich. S w i f t, F r y, S c h m i d t und Mitarbeiter (19,6,15) bewahrten das Trockengut lichtgeschützt bei Zimmertemperatur auf und verfügten bei Lagerungsende über zufriedenstellende Überlebensraten. F r y (6) betont aber, daß unter Umständen bei Aufbewahrung im Kühlschrank noch bessere Resultate hätten erzielt werden können. H ö r t e r (8) fand nach zweijähriger Lagerung bei + 4°C Überlebensraten von 80 - 100%. Der niedrigste Prozentsatz von überlebenden Keimen lag bei 46%. N e u m a n n(11) behauptet, daß die Lagerungstemperatur wahrscheinlich nur bei schlecht getrockneten Präparaten einen größeren Einfluß hat und bei Kenntnis einer optimalen Restfeuchtigkeit vernachlässigt werden kann. Im Gegensatz dazu bleibt nach V o s s(20) auch bei günstiger RF eine gewisse Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur bestehen. Eine Lagerung bei + 4°C erscheint günstiger als bei Zimmertemperatur bei + 18 bis 20°C. Es besteht nach Ansicht des Verfassers eine Relation zwischen Lagerfähigkeit und Temperatur. Eine Lagerfähigkeit von 4 Wochen bei + 37°C entspricht einer solchen von 1 Jahr bei + 4°C. S c h m i d t (16) fand bei Lagerung im Kühlschrank höhere Überlebensraten als bei Lagerung bei Zimmertemperatur.

## B. Pleuropneumonie-ähnliche Organismen - PPLO -

Nach der z.Zt. gültigen Nomenklatur Freundt (42) gehören diese Organismen zu der Ordnung Mycoplasmatales und der Gattung Mycoplasma. In dem nachfolgenden Schrifttum wird die jeweilige vom Verfasser gebrauchte Bezeichnung verwendet.

### 1. Vorkommen, Definition und Systematik der PPLO

Das Vorkommen der PPLO:
Die PPLO sind nach den heutigen Untersuchungen weit verbreitet. Man findet sie bei fast allen Tierarten, beim Geflügel anscheinend besonders häufig. Die Bezeichnung Pleuropneumonie-ähnliche Erreger (PPLO) ist aus der Verwandtschaft dieser Organismen zu dem filtrierbaren Agens Asterococcus mycoides, dem Erreger der Pleuropneumonie der Rinder, abgeleitet (Pleuropneumonia bovis). Dieser Erreger wurde 1898 von den französischen Forschern Nocard und Roux beschrieben. Frosch (44) und sein Mitarbeiter Dahmen berichten ausführlich über diesen Erreger.

Pleuropneumonie-ähnliche Erreger findet man nicht nur bei krankhaften Prozessen; sie werden auch im gesunden Organismus nachgewiesen. PPLO wurden beim Menschen, bei Hühnern und Küken, Rindern, Schafen, Ziegen, Hunden, Schweinen, Ratten und Mäusen beobachtet.

Röckl und Nasemann (66) isolierten bei 19% gesunden und bei 27% an unspezifischer Urethritis erkrankten Männern PPLO aus der Urethrea. Bei 74% der untersuchten Frauen waren ebenfalls PPLO nachweisbar. Die Verfasser kommen zu dem Schluß, daß PPLO harmlose Saprophyten des Urogenitaltraktes sind; das scheint auch das relativ häufige Vorkommen bei Frauen zu beweisen.

Insgesamt wurden 443 Patienten untersucht. Es gab keinen ausreichenden Beweis dafür, daß die PPLO Erreger der beobachteten Erkrankungen waren. Auch M o r t o n und Mitarbeiter (64) sehen die PPLO als weitverbreitete Mikroorganismen an.

Über das Vorkommen von PPLO beim Geflügel, insbesondere bei Hühnern und Truthähnen, und die evtl. pathogene Bedeutung dieser Mikroorganismen liegt ein umfangreiches Schrifttum besonders ausländischer Autoren vor. Eine ausführliche Darstellung im deutschen Schrifttum stammt von H a r t w i g k und H e n n i n g (48,50). Auch K ö h l e r, G e i ß l e r und M o n r e a l (60,45,63) haben über das Vorkommen von PPLO und ihre Bedeutung beim Geflügel berichtet.

Die Frage der Pathogenität der PPLO bei der CRD ist noch immer nicht endgültig geklärt. Sehr viele Autoren haben in letzter Zeit die PPLO allein oder in Verbindung mit Sekundärbakterien als Ursache der CRD erkannt, J u n g h e r r, A d l e r, C h u, K e l l e r, S m i b e r t, Y a m a m o t o und Mitarbeiter, M o n r e a l, S t u m p e e (53,24,28,57, 69,73,63). Über die Pathogenität der PPLO bei der Sinusitis der Puten berichten A d l e r und Mitarbeiter (22) und F a h e y (40). Die meisten Untersucher sind sich darüber einig, daß die CRD und die Putensinusitis die gleiche aetiologische Ursache haben.

E d w a r d u.a. (39) fanden bei 18 von 64 Kühen einer Herde mit gehäuftem Auftreten von Fortpflanzungsstörungen und entzündlichen Veränderungen der Genitalorgane und in 6 von 7 Bullenspermaproben PPLO. Die Kolonien der bovinen unterschieden sich nicht von denen der humanen Stämme. A l b e r t s e n (25) hält die PPLO im Bullensperma für einen gewöhnlichen Befund. Bei 33 von 35 Spermaproben wurden PPLO gefunden. Die genaue Untersuchung zeigte, daß die ermittelten PPLO aus dem Präputium stammten und nicht aus den oberen Teilen der Genitalien. B e r c h t o l d und B ö g e l (26) fanden PPLO bei mehreren Bullen, die an Azoospermie und Balanoposthitis

erkrankt waren. 4 von 8 künstlich infizierten Bullen wiesen die gleichen Krankheitssymptome auf.

PPLO sind auch die Erreger der ansteckenden Pleuropneumonie der Ziegen und der Agalaktie der Schafe und Ziegen. Ein Bericht des Internationalen Tierseuchenamtes in Paris (32) und 2 Jahre später Y a m a m o t o (74) beschreiben die Isolierung von PPLO aus der Gelenkflüssigkeit, aus Pleura, Lunge und Pericard von gestorbenen Ziegen. C o r d y (31) berichtet von einem Ausbruch einer folgenschweren Erkrankung in einer Milchziegenherde. An klinischen Symptomen wurde eine Arthritis und Septikämie festgestellt. Es wurden PPLO isoliert. Die Rückübertragung mit Erzeugung gleicher klinischer Symptome war möglich.

Definition:

Nach F r e u n d t (42) sind die PPLO durch folgende Eigenschaften gekennzeichnet:

a) Wachstum in zellfreien Nährböden. Bestimmte Nährstoffe sind für das Wachstum der meisten Arten erforderlich;

b) eine spezifische Art der Vermehrung, die durch Zerfall von Filamenten in coccoide Körperchen (mit mehr oder weniger ausgeprägter Tendenz zu echter Verzweigung) charakterisiert ist;

c) bedeutende, von kulturellen Bedingungen abhängige, Tendenz zum Pleomorphismus;

d) charakteristische Wachstumsform der kleinen Kolonien auf festen Nährböden;

e) Filtrierbarkeit der kleinsten vermehrungsfähigen Einheiten;

f) wenig Affinität zu den laborüblichen Bakterienfarbstoffen;

g) hohe Resistenz gegenüber Penicillin und Sulfathiazol.

**Systematik:**

Eine Fülle von Namen und Bezeichnungen finden sich für die PPLO in der Literatur. Die z.Zt. gültige Eingliederung nach E d w a r d und F r e u n d t (38) ist folgende:

Klasse II: Schizomyzetes von N a e g e l i 1857
Ordnung X: Mycoplasmatales F r e u n d t 1955
Familie I: Mycoplasmataceae F r e u n d t 1955
Genus I: Mycoplasma N o w a k 1929
Species 1: Mycoplasma mycoides B o r r e l et al.1910
Subspecies 1: M.mycoides var.mycoides. Erreger der Rinderpleuropneumonie. Typenstamm PG 1
Subspecies 2: M.mycoides var.capri. Erreger der Ziegenpleuropneumonie. Typenstamm PG 3
Species 2 - 10
Species 11: Mycoplasma gallinarum F r e u n d t 1955
Möglicherweise identisch mit dem Erreger der Chronic Respiratory Disease (CRD) und der Putensinusitis. Typenstamm PG 16
Species 12 - 15

Insgesamt sind 15 Species erfaßt. Diese Liste erhebt nicht den Anspruch auf Vollständigkeit. Besonders zu Species 11, Mycoplasma gallinarum, werden Ergänzungen nötig werden (zit.nach K ö h l e r (61).

2. Morphologie

PPLO bilden charakteristische Kolonien. Ein dichtes, bräunlich wirkendes Zentrum ist von einer flachen, dem Agar aufliegenden Zone umgeben. Die Dichte des Zentrums ist auf das Einwachsen der Kolonien in dieser Zone zurückzuführen. H a r t w i g k, R ö c k l und Mitarbeiter (48,49,66) sprechen von einem brustwarzenähnlichen Zentrum. Der zentrale Teil erscheint bei schwacher und stärkerer Vergrößerung granuliert. Die Peripherie besteht, wie in gefärbten Agarpräparaten gut zu sehen ist, aus großen runden Körperchen verschiedener Größe, oder aus ei-

ner schaum- bzw. wabenähnlichen Struktur, S a b i n, D i e n e s, E d w a r d, A l b e r t s e n, F r e u n d t, K a n d l e r (67,33,38,25,42,55) . Das Zentrum kann fehlen, oder es treten Kolonien mit 2 Zentren auf; in diesem Falle sind 2 Kolonien zusammengeflossen. Die Koloniegröße schwankt zwischen 0,1 - 0,6 mm. C o r d y und Mitarbeiter (31) geben als Maximalgröße 2 mm an. Nach Beimpfung des festen Nährbodens gehen die Kolonien nach 48 - 72 Stunden auf. Auf geeignetem festem Medium können die Kolonien nach S a b i n zwischen 10 und 20 µ klein und bis zu 600 µ groß sein. K a n d l e r (55) berichtet, daß die Form und Größe weitgehend von der Nährbodenzusammensetzung abhängig ist. Große Kolonien liegen hauptsächlich am Rand der Agarplatte. Eine Abimpfung von diesen großen Kolonien ergibt kleine Kolonien und wiederum sehr große in der Randzone. Anscheinend liegt die Ursache hierfür in unterschiedlichen Ernährungsbedingungen. Wurde die Agarkonzentration auf 2% erhöht, so zeigte sich langsameres Wachstum und eine starke Wölbung der Kolonie mit Ausbildung eines sehr kleinen Zentrums; in extremen Fällen fehlte das Zentrum. Wurde die Agarkonzentration auf 0,5% vermindert, so entstanden kleine rauhe Kolonien etwa von der Größe des Zentrums einer typischen PPLO-Kolonie.

Für die Untersuchung der Koloniemorphologie eignet sich die Agarfärbemethode nach D i e n e s sehr gut. Farblösung und Methode beschreibt K ö h l e r (61). K l i e n e b e r g e r-N o b e l, zit.n. K ö h l e r (61), berichtet über eine andere Färbemöglichkeit mit Hilfe einer Formvarfolie. Die Kolonien werden anschließend mit Giemsalösung gefärbt.

Untersuchungen über die mikroskopische Morphologie werden durch die Zartheit und Empfindlichkeit der Gebilde sehr erschwert. Schon die Änderung des osmotischen Druckes kann sie zerstören, E d w a r d (35). Alle Autoren betonen eine ausgesprochene Pleomorphie. K l i e n e b e r g e r, F r e u n d t, K a n d l e r, A l b e r t s e n (58,42,55,25) berichten aus-

führlich über die Feinstruktur der PPLO-Kolonien.

F r e u n d t beobachtete das Auswachsen von verzweigten Myzelien aus den Granula, den kleinsten vermehrungsfähigen Einheiten. Die Ausbildung feiner Filamente war in flüssiger Kultur erkennbar. Sie können in neue Elementarkörperchen zerfallen. Die Färbung nach D i e n e s zeigt, daß die Granula, die sog. Elementarkörperchen, manchmal in kleine gerollte Fäden auswachsen. Diese Färbung vermeidet Verzerrungen, weil die Organismen nicht getrocknet werden. Die Mikroorganismen erscheinen als winzige, oft bipolar gefärbte Stäbchen, oder als blasse ovale oder runde Formen. Zwischen beiden Typen besteht ein dauernder Übergang. Das Auftreten "großer Körper" (large bodies) betrachtet F r e u n d t als einen degenerativen Vorgang in glukoseenthaltenden Medien. Die Größe der Granula wird nach F r e u n d t mit 0,2 - 0,3 µ nach D i e n e s mit 0,2 - 1 µ, nach K l i e n e b e r g e r mit 0,125 - 0,250 µ angegeben.

Die meisten Autoren empfehlen die Färbemethode nach Giemsa (Langsamfärbung). Die Gramfärbung ergibt nur blasse schlechte Bilder, K e l l e r, F r e u n d t, S a b i n.
Nach C h u (28) ist die Methode der Fixierung genauso wichtig wie das Färben. Fixieren in Methylalkohol oder Bouinscher Lösung ergibt die besten Resultate.

3. Züchtung der PPLO

a) Nährböden, Zusatz von Bakteriostatika

Für die Züchtung von PPLO sind eiweißreiche Nährböden erforderlich. Eine Züchtung auf gewöhnlichen Agarnährböden gelingt nicht. Im allgemeinen wird ein 20-30%-iger Ascites- oder Serumagar verwendet. Verschiedene wachstumfördernde Zusätze werden von den Autoren empfohlen. Auch das unterschiedliche Wachstum gleicher PPLO-Stämme auf verschieden zusammengesetzten Nährböden wird beschrieben.

Der am häufigsten verwendete Nährboden nach E d w a r d (34) besteht aus Rinderherzwasser, Bacto-Pepton tryptisch verdaut (Brunnengräber), Hefeextrakt und Agar-Agar. H a r t w i g k modifizierte das E d w a r d s c h e Medium für deutsche Verhältnisse. Sein Nährboden besteht aus Rinderherzwasser 100 ml, Bacto-Pepton tryptisch verdaut (Brunnengräber) 10 g, Hefeextrakt (Vitam-Bact.) 5 g, Agar-Agar 15 g. Das Medium wird auf pH 8,0 eingestellt und als Grundagar in Vorrat genommen. Vor Gebrauch werden dem Grundmedium 10% Bäckerhefeautolysat, 20% Rinderserum, Penicillin 50 i.E./ml und Thalliumacetat in 1%-iger Lösung (1:8000 i.Nährboden) zugesetzt. Das verwendete Rinderserum bietet nach H a r t w i g k (48) gegenüber dem in der Literatur angegebenen Pferdeserum keinen ersichtlichen Nachteil. Der Penicillinzusatz dient der Hemmung der grampositiven und der Thalliumacetatzusatz der Hemmung der gramnegativen Keime. Die Platten sollen bei Beimpfung etwas feucht sein. Reicht die Feuchtigkeit an der Oberfläche des Nährmediums nicht aus, so empfiehlt H a r t w i g k, einen Tropfen einer gewöhnlichen Nährbouillon (pH 7,4 - 7,6) auf dem Nährboden zu verteilen. Für die Erhaltung des isolierten Stammes ist nach H a r t w i g k der halbfeste Nährboden (0,3%-iger Agar der gleichen Zusammensetzung wie der feste Agar) in Hochschicht sehr geeignet. Die Keime wachsen meist unterhalb der Oberfläche.

Flüssige Nährböden werden entweder zur Anreicherung oder zur biochemischen Differenzierung reingezüchteter Mycoplasmen ohne Zusatz von Hemmstoffen (Penicillin und Thalliumacetat) verwendet. Die Zusammensetzung entspricht dem festen Nährboden. Zur biochemischen Differenzierung wird ein Kohlehydrat 0,5%-ig und als Indikator Phenolrot zugesetzt; die Endkonzentration soll 1 : 5000 betragen.

Im halbfesten Medium zeigt sich nur in der obersten Schicht (1 cm unter der Oberfläche) Wachstum. Auf festem Nährmedium

wachsen die PPLO in typischer Kolonieform.

S a b i n hat Blindpassagen durchgeführt und beobachtete gutes Wachstum, nachdem die Erstkultur über Wochen negativ geblieben war.

Nach S a b i n (67) zeigt sich das Wachstum von PPLO im flüssigen Medium durch eine diffuse Trübung. In Erstkulturen sind die ersten Wachstumserscheinungen nicht vor dem 3. bis 4. Tag festzustellen. Die Trübung ist nur im Vergleich mit dem unbeimpften flüssigen Medium sichtbar.

S a b i n unterscheidet parasitäre Formen, die zum Wachstum Eiweiß benötigen und saprophytäre Formen, die sich im eiweißfreien Nährmedium entwickeln können. Die Mikroorganismen können sich so an eine Serumart gewöhnen, daß sie sich nicht, oder nur sehr spärlich, in einem Kulturmedium mit einer anderen Serumart vermehren. Diese Eigenschaft beobachtete er an einigen Mäusestämmen.

Nach E d w a r d und Mitarbeitern (36) kann ein ätherischer Extrakt von Eidotter das Serum im Kulturmedium ersetzen. Cholesterin dürfte ein wesentlicher Wachstumsfaktor für PPLO sein, jedoch nicht bei den L-Formen der Bakterien. Eine Ausnahme bilden die saprophytären Stämme. K l i e n e b e r g e r-N o b e l und E d w a r d fanden, daß Filtrate aus Staphylokokkenkulturen das Wachstum der PPLO förderten.

Die für das Wachstum von PPLO günstigsten pH-Werte liegen nach Angabe der meisten Autoren zwischen 7,4 - 8,0. Bei einem pH-Wert unter 7,0 ist das Wachstum gewöhnlich vollkommen gehemmt, S a b i n (67). F r e u n d t (41) dagegen beobachtete PPLO-Stämme aus dem Urogenitalsystem von Frauen, die bei pH 4,9-6,3 aufgingen.

Die Übertragung der PPLO von Festnährböden zu Festnährböden erfolgt nach Angabe der meisten Autoren mittels eines gut bewachsenen Agarblocks, der mit der Kolonieseite auf einer frischen Agarplatte ausgestrichen wird und dort liegenbleibt.

Halbflüssige oder flüssige Nährmedien werden mit gut bewachsenen Agarstückchen beimpft.

Um die Erstisolierungen von PPLO zu erleichtern, die häufig von im Untersuchungsmaterial vorhandenen Bakterien überwuchert werden, setzt man den Nährböden Hemmstoffe zu. Am häufigsten wird Penicillin in verschiedenen Konzentrationen und Thalliumacetat verwendet. E d w a r d (39) hat die Wirkung mehrerer bakteriostatischer Substanzen auf PPLO-Stämme untersucht. Penicillin und Thalliumacetat erleichterten die Erstisolierung von Stämmen auf Plattenkulturen. Die Zugabe von Thalliumacetat allein zum Medium, das zur Stammhaltung in Subkulturen benutzt wurde, verminderte die Zahl der Kolonienverschmelzungen. Die untersuchten Medien ergaben variierende Resultate. Sie waren von der jeweiligen Serum - charge abhängig, die zur Anreicherung benutzt wurde. Eine routinemäßige Zugabe von frischem Hefeextrakt zeitigte übereinstimmend gutes Wachstum der getesteten Stämme.

D i e n e s (33) benutzte ebenfalls Penicillin für die Isolierung. Er macht aber auf die Möglichkeit aufmerksam, PPLO-Kolonien mit den L-Phasen von Bakterien zu verwechseln, deren Wachstum durch das Antibiotikum induziert wird. Die Diagnose PPLO ist erst nach Übertragung auf penicillinfreie Medien gesichert. Neben Penicillin und Thalliumacetat werden auch Kristallviolett und Kaliumtellurit als Hemmstoffe verwendet.

b) Stammhaltung

Zur Stammhaltung über längere Zeit werden die PPLO meist in 8-tägigem Abstand auf frische Medien übertragen. Es sind aber auch Methoden der Aufbewahrung ohne regelmäßige Passagierung beschrieben worden (H a r t w i g k, H e n n i n g 48,50).

K e l l e r (57) beobachtete, daß isolierte PPLO-Kulturen bei 37°C kaum länger als 1 Woche, im Kühlschrank auf Agar gut 14 Tage, haltbar waren. Er empfiehlt die Aufbewahrung

auf Trockeneis; dabei bleibt die Vermehrungsfähigkeit erhalten.

S a b i n (67) hielt seine Stämme 5 - 6 Wochen. Sie wurden im Kühlschrank aufbewahrt und in 10 - 14-tägigem Abstand überimpft. Dem Kulturmedium wurde Zucker hinzugefügt. Kulturen auf Festmedien, auf mit Paraffin versiegelten Platten oder in ebenso versiegelten Röhrchen wurden monatlich überimpft.

Um nicht die pathogenen oder anderen Eigenschaften der Stämme durch zu zahlreiche Passagen zu verändern, wird die Methode der Bakterienaufbewahrung nach S w i f t angewandt. 25 oder mehr ml gut bewachsener Bouillon werden bei 4 - 5000 U/min 1 Stunde zentrifugiert. Ungefähr 10% des Überstandes werden zur Resuspendierung des Sedimentes zurückgelassen. Die konzentrierte Suspension wird in 0,1 ml aufgeteilt, in mit Watte verschlossenen Röhrchen auf fester Kohlensäure schnell eingefroren und in einen gekühlten Trocknungsapparat übergeführt, der $P_2O_5$ enthält. Die Temperatur wird während der ganzen Periode der Evakuierung und Trocknung, die gewöhnlich nicht länger als 24 Stunden dauert, auf -10° bis -20°C gehalten. Die Röhrchen werden dann verschlossen und bei Zimmertemperatur aufbewahrt, um ein Platzen zu verhüten. Die PPLO wurden mehr als 1 Jahr erfolgreich aufbewahrt.

K l i e n e b e r g e r - N o b e l, zit. n. K ö h l e r (61), empfiehlt die Aufbewahrung von Bouillonkulturen bei -20°bis -30°C. Die PPLO bleiben dann mehrere Monate am Leben.

H a r t w i g k bewahrte reingezüchtete PPLO-Stämme in halbflüssigem 0,3%-igem Agar auf. Die Keime blieben 3 - 4 Wochen ohne Überimpfung lebensfähig.

c) PPLO und die L-Phase von Bakterien

Es besteht nach Ansicht der zitierten Autoren kein Zweifel, daß die PPLO zu einer eigenen Familie gehören und keine Beziehungen zu den L-Phasen der Bakterien bzw. zu deren stabilen Formen haben.

F r a u K l i e n e b e r g e r entdeckte 1935 die L-Form von Streptobazillus moniliformes, einem gramnegativen und pleomorphen Bazillus, der normalerweise im Nasenrachenraum der Ratte lebt. Sie glaubte, einen PPLO-Stamm gefunden zu haben. Später wurde bewiesen, daß der vermeintliche PPLO-Stamm eine Variante des Bazillus war. Seither hat die Autorin grundlegend über die PPLO und die L-Phasen von Bakterien gearbeitet (59).

Auch D i e n e s, F r e u n d t und E d w a r d (33,35) beschreiben ausführlich die Unterschiede zwischen den L-Phasen und den PPLO.

L-Phasenwachstum wurde sicher festgestellt in Kulturen der Bakterien:

Streptobazillus
Gonokokkus
Echerichia
Proteus
Salmonella

Die Ursache dieser besonderen Form des Wachstums als Variante des Bakteriums ist in ungünstigen Wachstumsbedingungen oder auch in der Einwirkung von Penicillin zu suchen.

Nach K l i e n e b e r g e r - N o b e l (59) ist die Ähnlichkeit der L-Phasen der Bakterien und der PPLO in ihrer Kolonieform, der Weichheit und dem Pleomorphismus ihrer Einzelformen auffallend. Die meisten Bakterienarten produzieren jedoch L-Kolonien nicht spontan. Sie können aber durch verschiedene Mittel dazu gebracht werden, wie z.B. durch Penicillinzusatz zum Nährboden. Penicillin wirkt auf spontan und nicht spontan L-Phasen

produzierende Kulturen. Bei den spontan reagierenden genügen 0,1 i.E., um die normalen Bakterien am Wachstum zu hindern und nur L-Kolonien entstehen zu lassen. Nach gewisser Zeit ergeben sich stabile L-Formen auch auf Nährböden ohne Penicillin (D i e n e s). Die L-Stämme wachsen mit fortschreitenden Passagen in allen Fällen üppiger und werden in der Grobheit immer bakterienähnlicher, "sie verraten ihre Herkunft". (K l i e n e b e r g e r, zit.n. K a n d l e r (54) ).

K l i e n e b e r g e r (59) und E d w a r d (35) stellten im elektronenoptischen Bild bei PPLO eine große Menge einheitlicher kleinster Elemente fest, die in L-Phasen-Kulturen von Bakterien bisher nicht gefunden wurden.

Auf festen Nährböden zeigen die L-Formen und die PPLO annähernd gleiche Kolonieformen. Die Morphologie zeigt in hohem Maß Übereinstimmungen. Das Wachstum ist abhängig von der Gegenwart von Serum bzw. Ascites. Beide zeigen nach E d w a r d (35) wenig Empfindlichkeit gegen Penicillin.

Nach K a n d l e r (55) bilden die L-Formen unregelmäßige bräunliche Haufen. Sie wachsen auf festen Nährböden kompakter als auf weicheren. In keinem Fall wurde eine ähnlich typische Gliederung in Zentrum und Rand wie bei PPLO festgestellt. Die Oberfläche der L-Phasenkolonie ist außerdem oft rauh und wabig strukturiert. Wahrscheinlich ist hierfür die Einlagerung von Lipoidtropfen verantwortlich zu machen. Die L-Phasenkolonie kann mehrere mm groß und für das unbewaffnete Auge deutlich sichtbar werden.

Widerstandsfähigkeit der PPLO gegen physikalische Faktoren

Durch ihre feine Struktur sind PPLO empfindlicher als andere Bakterien. Sie besitzen keine Zellmembran, sondern nur ein Plasmolemma, (R u s k a und P o p p e, 1948). Durch diese Eigenschaft reagieren sie auf die Veränderung des osmotischen Druckes sehr empfindlich. Das zeigt sich besonders bei den Färbemethoden, C h u, D i e n e s (28,33).

Umfangreiche Untersuchungen führten S m i t h und S a s a k i (70) mit 4 Stämmen humaner und aviärer Herkunft durch. Abwechselndes Einfrieren und Auftauen in Aqua dest. führte zu starkem Abfall der Lebendkeimzahl. In physiologischer Kochsalzlösung war die Absterberate nicht so hoch. Lyophilisierung im Kulturmedium wurde anstandslos vertragen. Aqua dest. eignete sich nicht für die Lyophilisierung der PPLO. Temperaturen über 4°C wurden nur im Kulturmedium längere Zeit vertragen; bei Verwendung anderer Medien trat eine Abtötung innerhalb weniger Stunden ein. In einem natursauren Medium verhielten sich die Organismen unabhängig von der Temperatur sehr labil. B u t l e r und Mitarbeiter (27) berichten über die Suspendierung von gewaschenen PPLO in 0,85%-iger NaCl-Lösung bei Zimmertemperatur. Ihre Versuchsstämme starben im Gegensatz zu den Versuchsergebnissen von S m i t h und S a s a k i (70) sofort ab. Die Überlebensrate war gut in einer Kaliumphosphatlösung von 2 - 4°C.

5. Nachweis der PPLO

Der Nachweis der PPLO erfolgt kulturell. Der indirekte Nachweis wird durch serologische Untersuchungen geführt. Die im vorstehenden erläuterten Eigenschaften der Organismengruppe müssen vorhanden sein (Definition nach F r e u n d t), und eine endgültige Diagnose ist erst gesichert durch Nachweis des Wachstums auf penicillinfreien Nährböden.

## III. Eigene Untersuchungen

### A. Material

Die nachstehenden Versuche wurden mit 6 Mycoplasmen-Stämmen aviärer Herkunft durchgeführt. 5 von ihnen stammten aus der insgesamt 464 Stämme enthaltenden Institutssammlung. Der 6. Stamm, PPLO x 95, wurde dem Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt von Herrn Dr. R i c h t e r, Firma Nobilis, Boxmeer, Holland, zur Verfügung gestellt und mir in einer Subkultur für Kontrolluntersuchungen überlassen. Der Stamm x 95 wurde von M a r k h a m isoliert und wird in den USA für die Antigenherstellung verwendet. Nach Dr. Richter hat er wahrscheinlich viele Passagen auf künstlichen Nährböden durchgemacht. Er wurde dem Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt in Münster lyophil getrocknet überlassen. Der Stamm wuchs in der Subkultur in Bouillon und auf festen Nährböden spontan an; er erwies sich in allen Versuchen als sehr frohwüchsig.

Die 5 eigenen Versuchsstämme: Mü 97, Mü 100, Mü 106, Mü 113, Mü 19 f wurden aus zur Sektion eingesandten Hühnern isoliert. Es wurden folgende Sektionsbefunde erhoben:

| | | |
|---|---|---|
| Mü 97: | Junghenne: | Leukose |
| Mü 100: | Junghenne: | Fibrinöse Sinusitis und Luftsackentzündung |
| Mü 106: | Junghenne: | Leukose |
| Mü 113: | Huhn: | Katarrhalische Sinusitis |
| Mü 19f: | Junghenne: | Akute Katarrhalische Sinusitis und Konjunktivitis |

Bereits nach 24 Stunden erschienen auf dem festen Nährmedium die typischen Kolonien mit Zentrum.

Alle 5 Stämme erwiesen sich biochemisch aktiv; sie ver-

goren Glukose, Maltose, Dextrin und Glykogen.

Die Stämme wurden alle 14 Tage passagiert. Es wurden 0,5 ml bewachsene PPLO-Bouillon mit steriler Pipette auf eine PPLO-Agarplatte gebracht und 3 Tage bei 37°C bebrütet. Dann wurde das Wachstum bakterioskopisch überprüft und ein gut bewachsenes Agarstück in ein Reagenzröhrchen mit 5 ml PPLO-Bouillon gebracht und ebenfalls 3 Tage bei 37°C bebrütet. Danach wurde die bewachsene Bouillon für weitere 14 Tage bei + 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Die isolierten Stämme hielten sich so aufbewahrt bis zu 50 Tagen und wiesen eine annähernd gleichbleibende Wachstumsstärke auf.

Für die Z ü c h t u n g der Mycoplasmen wurde ein fester und ein flüssiger Nährboden benutzt. Das feste Nährmedium hatte folgende Zusammensetzung: 34 g PPLO-Agar (Difco) wurden zusammen mit 5 g Vitam-Bact (ein Hefeextrakt der Firma Vitam, Tameln) in 100 ml Aqua dest. bis zur vollständigen Lösung zum Kochen gebracht. Danach wurde der Agar in Mengen von 200 ml aufgeteilt und 15 Minuten lang autoklaviert. Zu 200 ml dieses Grundagars kamen nach Abkühlung 20 ml Hefeautolysat, 45 ml nichtinaktiviertes Pferdeserum, 6,8 ml einer 1%-igen Thalliumacetatlösung und 100.000 i.E. Penicillin. Dem Rinderserum und der PPLO-Serumfraktion (Difco) erwies sich das Pferdeserum als überlegen. Das Pferdeserum wurde durch Berkefeldkerzen der Porengröße N filtriert und auf Frischblutagarplatten auf Keimfreiheit überprüft. Die Einstellung des pH-Wertes des Nährbodens auf 7,3 erfolgte mit dem Ionometer nach Pusl.

Die Bouillon setzte sich zusammen aus 770 ml Rinderherzwasser, 10 g Bacto Pepton (Difco), 5 g Vitam-Bact, 100 ml Hefeautolysat und 25 ml einer 1-%-igen Thalliumacetatlösung. Die Lösung wurde 30 Minuten lang im Dampftopf erhitzt, nach Abkühlung mit 100 ml Pferdeserum sowie 200.000 i.E. Penicillin versetzt und auf pH 7,3 eingestellt.

Als Schutzlösung diente Aqua dest., physiologische NaCl-Lö-

sung und durch Zentrifugieren entrahmte Kuhmilch mit 7,5% Glukosezusatz. Ihr pH-Wert betrug nach dem Sterilisieren mit dem Spezialindikatorpapier der Firma Merck gemessen 6,0 bzw. 6,1, gemessen mit dem Ionometer nach Pusl. Die Schutzlösung wurde nach Glukosezusatz für eine halbe Stunde 2 mal hintereinander bei 100°C im Dampftopf erhitzt. Als 4.Schutzlösung wurde Mixtura desiccans nach F r y benutzt. Sie setzt sich zusammen aus 75% Rinderserum, 25% Nährbouillon und 7,5% Glukose. Das Rinderserum wurde durch Berkefeldkerzen der Größe N filtriert und nach Überprüfung auf Keimfreiheit mit Hilfe von Frischblutagarplatten zu der sterilisierten Nährbouillon mit 7,5% Glukosezusatz gegeben. Der pH-Wert der Mixtura desiccans betrug 7,5 nach dem Spezialindikatorpapier der Firma Merck und 8,1 nach Messung mit dem Ionometer nach Pusl. Diese stark differierenden pH-Werte ergaben sich bei jeder Neuansetzung der Fryschen Lösung.

Die Präparate für die bakterioskopische Untersuchung wurden wie folgt angefertigt:

a) Giemsafärbung des Abklatschpräparates

Auf einen gut bewachsenen Teil einer Agarkultur wurde ein Deckgläschen gelegt, leicht angedrückt, abgehoben und nach Lufttrocknung 5 Minuten lang mit Methanol fixiert. Anschließend wurde das Deckgläschen für 18 - 24 Stunden in eine frisch zubereitete Giemsalösung ( 1 : 20 ) gebracht. Nach Wasserspülung und Lufttrocknung erfolgte das Aufkitten auf einen Objektträger mit Caedax. Die bakterioskopische Untersuchung wurde zuerst mit schwachem Trockensystem und dann mit Ölimmersion vorgenommen.

b) Agarfärbemethode nach D i e n e s

Ein Agarblöckchen mit Mycoplasmenkolonien wurde mit der Schichtseite auf ein Deckgläschen gelegt, auf dem eine Azurmethylenblaulösung angetrocknet war. Die Farblösung besteht nach K ö h l e r (pers.Mitteilungen (61)) aus:

Methylenblau 2,5 ml, Azur II 1,25 ml, Maltose 10,0 ml, $Na_2CO_3$ 0,25 ml, Benzoesäure 0,2 ml, Aqua dest. 100,0 ml. Nach Auflegen des Deckglases auf einen Objektträger wurden die Ränder mit Paraffin abgedichtet. Die Färbung dauerte nur einige Minuten.

## B. Methodik und Versuchsergebnisse

Das Ausgangsmaterial für alle Versuche wurde jeweils nach dem gleichen Schema gewonnen. 0,5 ml einer gut bewachsenen PPLO-Serumbouillon wurden mit einer sterilen Pipette auf eine PPLO-Agarplatte gebracht, mit sterilem Glasspatel ausgespatelt und 3 Tage bei 37°C bebrütet. Danach wurde das Wachstum bakterioskopisch überprüft, die Platten waren immer gleichmäßig dicht mit Kolonien besiedelt und der Agar in 4 gleich große Teile geteilt. Jedes Teilstück wurde in 3 - 4 Agarstreifen zerlegt und diese in 100 ccm fassende Erlenmeyerkölbchen mit ca. 30 ml PPLO-Bouillon gebracht. Insgesamt wurden 4 Kölbchen beimpft, die anschließend 3 Tage bei 37°C bebrütet wurden. Nach dieser Zeit war die Bouillon in jedem Fall gut bewachsen.Es wurde jedesmal eine Probeplatte beimpft und mit dem Mikroskop das Wachstum geprüft. Das Aussehen der bewachsenen Bouillon variierte; sie war entweder fast klar oder leicht diffus getrübt mit einem geringfügigen leicht aufschüttelbaren Bodensatz. Der Trübungsgrad ließ keine Schlüsse über die Wachstumsdichte zu. Der Inhalt jedes Kölbchens wurde steril in 50 ccm fassende Zentrifugierbecher gefüllt, 10 ccm unbewachsene PPLO-Bouillon zur Verdünnung hinzugefügt und 1 Stunde bei 10.000 U/min. entsprechend einer Normalbeschleunigung von 11.000 g zentrifugiert. Zum Zentrifugieren wurde die Pirouette, Hochleistungslaborzentrifuge (Winkelzentrifuge) der Firma Phywe A.G.,Göttingen, benutzt, mit einer Höchstleistung von 15.000 U/min. Das entspricht einer Normalbeschleunigung von 25.000 g. Der

Überstand wurde abgegossen und auf Mycoplasmenwachstum durch Beimpfung einer Agarplatte mit 0,5 ml des Überstandes überprüft. Dabei wurde stets Wachstum einzelner Kolonien festgestellt. Die Mikroorganismendichte im Zentrifugat war aber für die Versuche durchaus ausreichend, so daß sich höhere Tourenzahlen beim Zentrifugieren zur Erzielung höherer Ausbeute erübrigten.

Jedes Zentrifugat wurde in 1,5 ml der einzelnen Schutzlösungen aufgenommen und mit Hilfe einer Rekordspritze im Zentrifugierbecher sorgfältig durchgemischt. Von diesen Suspensionen wurden je 3 Verdünnungen hergestellt, die sich nach zahlreichen Vorversuchen als die günstigsten für Vergleichsuntersuchungen erwiesen hatten. Die Verdünnungen waren: neben dem unverdünnten Original, d.h. Ausgangsaufschwemmung = Zentrifugat + 1,5 ml der Schutzlösung, 1 : 10.000, 1 : 100.000, 1 : 1.000.000.

Der Grad der Verdünnung wurde so hoch gewählt, um ein Auszählen der sehr üppig wachsenden kleinen Kolonien überhaupt möglich zu machen. Von jeder Verdünnung und dem Original wurde in allen Versuchen 0,1 ml mit steriler Pipette auf eine PPLO-Agarplatte übertragen und mit sterilem Glasspatel auf der Oberfläche gleichmäßig verteilt. Nach der Beimpfung wurden die Platten 3 Tage bei 37°C bebrütet. Danach wurden die gewachsenen Kolonien mit dem Mikroskop bei einer Lupenvergrößerung 3,5 : 1 Okular 6 x B der Firma E.Leitz, Wetzlar und mit Hilfe einer Zählscheibe gezählt. Die Zählscheibe als Hilfsmittel bei der Auszählung der mit unbewaffnetem Auge nicht immer sichtbaren Mycoplasmenkolonien entwickelte Dr. H ö r t e l. Sie ist im Anhang abgebildet, entspricht in ihrem Durchmesser einer Petrischale und wurde mit Tesafilmstreifen unter dem Boden der Agarplatte befestigt. Jedes der 5 Zählquadrate hat eine Seitenlänge von 1 cm und umfaßt 36 Teilquadrate; jedes

Teilquadrat hat eine Seitenlänge von 1 mm. Die 5 Zählquadrate sind auf der Scheibe unregelmäßig angeordnet; eines liegt zentral, der Abstand der beiden Quadrate voneinander in der oberen Hälfte der Zählscheibe beträgt 2,5 cm, der der unteren 3,5 cm. Durch diese unregelmäßige Anordnung ergibt sich ein gutes Bild der durchschnittlichen Wachstumsdichte auf der Platte. Die Fehlerbreite ist bei Verwendung der gleichen Zählscheibe für alle Versuche ungefähr die gleiche, da durch die Ausspatelung des 0,1 ml Mycoplasmensuspension eine gleichmäßige Ausbreitung der Kolonien über die ganze Platte gegeben ist.

Alle Stämme wuchsen zufriedenstellend auf PPLO-Agar. Sie bildeten die typischen zarten, farblosen, runden, an der Oberfläche leicht gewölbten, Kolonien mit einem mehr oder weniger deutlichen Zentrum. Das früheste Wachstum zeigte sich häufig bereits nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C. Nach 48 - 72 Stunden bildeten sich die typischen Kolonien in der Größenordnung von 10 - 400 Mikra Ø. Durchmesser und Aussehen der Kolonien waren nicht immer gleich. Die Wachstumsdichte beeinflußte die Kolonieform sehr stark. Bei Verimpfung von 0,5 ml der bewachsenen Bouillon auf Agar war eine sehr dichte Besiedlung der Agarplatte zu beobachten. Die Kolonien erreichten dann im Durchschnitt eine Größe von 10 - 20 Mikra Ø, und es bildete sich kein Zentrum. Nur einige am Rand des Nährbodens liegende Kolonien wurden größer (20 - 150 Mikra Ø) und bildeten das typische warzenförmige Zentrum. Bei den in allen Versuchen hergestellten starken Verdünnungen waren einzeln stehende 200 - 400 Mikra große Kolonien zu beobachten mit einem deutlichen, oft granuliert aussehenden dunklen Zentrum. Es zeigten sich auch große zusammengeflossene Kolonien mit 3 - 4 Zentren.

Die Giemsa-Langsamfärbung (18 - 24 Std.)des in Methanol fixierten Abklatschpräparates eines gut bewachsenen Agarstückes zeigte die Mycoplasmen als rundliche kokkoide Gebilde mit einem blassen, rötlich-violetten Farbton. Sie ließen sich bei kon-

stanter Färbezeit nicht ganz gleichmäßig anfärben; auch in ein und demselben Präparat traf man verschieden stark gefärbte Mikroorganismen an. Die bakterioskopische Untersuchung erfolgte zunächst mit schwachem Trockensystem und dann mit Ölimmersion.

Die Darstellung der Mycoplasmen gelang besonders gut mit der Agar-Färbemethode nach D i e n e s.

Um sicher zu gehen, daß nur isolierte PPLO-Stämme für die Versuche verwendet wurden, erfolgte die Züchtung auch auf penicillinfreien Nährböden. Die Mycoplasmen zeigten ein typisches, aber nicht sehr dichtes Wachstum. Es bildete sich bei den nur kleinen Kolonien von 10 - 50 Mikra Ø nicht in allen Fällen ein Zentrum. Die Kolonien wurden auch bei weniger dichter Besiedlung der Agarplatte nicht größer.

1. Einfluß verschiedener Schutzmedien auf die Überlebensrate

Als Schutzlösung wurden Aqua dest., physiologische NaCl-Lösung, Magermilch mit 7,5% Glukose und Mixtura desiccans verwendet. Die Einwirkungszeit auf das Mycoplasmenmaterial in den Verdünnungen: Original, 1 : 10.000, 1 : 100.000, 1 : 1.000.000 betrug 0 Std., 1 1/2 Std., 3 und 6 Std.

Die Auszählung der gewachsenen Kolonien nach dreitägiger Bebrütung ergab die in der Tabelle I zusammengefaßten Werte.

Die angegebenen Zahlen in der Tabelle sind nur relative Werte. Sie ergeben sich aus der Summe der ausgezählten Kolonien in den 5 Zählquadraten der Platten mit der Verdünnung $10^4$. Die Rubrik Wachstumsdurchschnitt in Millionen Kolonien/0,1 ml gibt somit auch nur die relative Wachstumsdichte auf der Originalplatte an, bezogen auf die Kolonienzahl der 5 Zählquadrate der Verdünnung $10^4$. Wir glauben aber, mit dieser Methode vergleichbare Werte erzielen zu können.

Tabelle I

| Stamm | Verdg. | Zahl der Kolonien | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Agma dest. | | | | Nacl-Lösung 0,85% | | | | Ma | |
| | | 0 Std. | 1½ Std. | 3 Std. | 6 Std. | 0 Std. | 1½ Std. | 3 Std. | 6 Std. | 0 Std. | |
| Mü 97 | Original | ++++ | ++++ | ++ | + | ++++ | ++++ | - | - | ++++ | + |
| | $10^4$ | - | - | - | - | - | - | - | - | 1243 | |
| | $10^5$ | - | - | - | - | - | - | - | - | 36 | |
| | $10^6$ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Mü 100 | Original | ++++ | ++++ | ++ | + | ++++ | ++++ | + | - | ++++ | + |
| | $10^4$ | 42 | - | - | - | 3620 | - | - | - | 1404 | |
| | $10^5$ | 64 | - | - | - | 6 | - | - | - | 46 | |
| | $10^6$ | - | - | - | - | - | - | - | - | 4 | |
| Mü 106 | Original | +++ | ++ | - | - | +++ | ++++ | +++ | + | ++++ | + |
| | $10^4$ | 8 | - | - | - | 3000 | 3850 | 1230 | 20 | 3400 | |
| | $10^5$ | 1 | - | - | - | 1913 | 1496 | 623 | 116 | 341 | |
| | $10^6$ | - | - | - | - | 127 | 120 | 75 | 16 | 38 | |
| Mü 113 | Original | +++ | ++ | + | - | +++ | +++ | ++ | - | +++ | + |
| | $10^4$ | - | - | - | - | - | - | - | - | 5 | |
| | $10^5$ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | $10^6$ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Mü 194 | Original | +++ | ++ | ++ | + | ++++ | +++ | - | - | +++ | |
| | $10^4$ | - | - | - | - | - | - | - | - | 26 | |
| | $10^5$ | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | |
| | $10^6$ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| PPLO x95 | Original | ++++ | ++++ | +++ | - | ++++ | +++ | +++ | - | ++++ | + |
| | $10^4$ | 3200 | 2500 | - | - | 2500 | 240 | - | - | +++ | |
| | $10^5$ | 102 | - | - | - | 578 | 8 | - | - | 1032 | |
| | $10^6$ | - | - | - | - | 27 | - | - | - | 99 | |

++++ = rasenartiges Wachstum
+++ = sehr dichtes Wachstum
(Kolonien nicht auszählbar)
++ = über 2.000 Kolonien

| Zahl der Kolonien | | | | | | Wachstumsdurchschnitt in Millionen Kolonien (0,1 ml – Originalplatte – | | Absterbequote in % nach 6 Std. Einwirkung. Verdg. $10^4$ | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Mixt. desicc. | | | | | | | | | |
| d. | 6 Std. | 0 Std. | 1½ Std. | 3 Std. | 6 Std. | Magerm. | Mxt. desicc. | Aqu. dest. | NaCl | Mag. | Mixt. |
| ++<br>71<br>5<br>3 | ++++<br>1408<br>27<br>– | ++++<br>2681<br>317<br>30 | ++++<br>1744<br>338<br>40 | ++++<br>2204<br>235<br>40 | ++++<br>2617<br>367<br>30 | 12,7 | 22,3 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| ++<br>1<br>6<br>7 | ++++<br>1741<br>35<br>2 | ++++<br>922<br>50<br>– | ++++<br>1489<br>58<br>3 | ++++<br>1870<br>26<br>1 | ++++<br>1259<br>37<br>1 | 16,7 | 14,3 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| ++<br>50<br>1<br>. | ++++<br>3200<br>205<br>21 | ++++<br>8100<br>777<br>– | ++++<br>9550<br>1241<br>114 | ++++<br>8500<br>824<br>47 | ++++<br>6400<br>583<br>45 | 44,8 | 81,3 | 100 | 94,3 | 5 | 20 |
| + | +++<br>3<br>–<br>– | ++++<br>10<br>–<br>– | ++++<br>–<br>–<br>– | +++<br>10<br>–<br>– | +++<br>10<br>–<br>– | 0,03 | 0,07 | 100 | 100 | 40 | 0 |
| + | +++<br>13<br>1<br>– | ++++<br>51<br>1<br>– | +++<br>55<br>–<br>– | +++<br>67<br>2<br>– | +++<br>49<br>2<br>– | 0,16 | 0,55 | 100 | 100 | 50 | 4 |
| ++<br>+<br>1<br>1 | ++++<br>+++<br>1373<br>107 | ++++<br>++<br>369<br>28 | ++++<br>++<br>446<br>51 | ++++<br>++<br>237<br>23 | ++++<br>++<br>286<br>6 | 155,7 | 33,4 | 100 | 100 | 0 | 22 |

Wegen der sehr großen Wachstumsdichte wurde die Verdg. $10^5$ zu Grunde gelegt.

**Ergebnisse des ersten Versuches:**

Die mit unverdünnter Suspension beimpften Platten zeigten immer rasenartiges Wachstum, das sich jedoch nach 6-stündiger Einwirkungszeit von Aqua dest. bzw. physiologischer NaCl-Lösung stark verringerte oder überhaupt nicht mehr festzustellen war. In den Verdünnungen $10^4$ - $10^6$ der Schutzlösungen Magermilch und Mixtura desiccans wuchsen die Kolonien in typischer Form mit Ausbildung eines deutlichen Zentrums. Sie erreichten im Durchschnitt eine Größe von 100 - 200 Mikra Ø, mitunter sogar 400 Mikra Ø. Übereinstimmend zeigte sich bei allen 5 Versuchsstämmen und dem sehr frohwüchsigen Kontrollstamm x 95 die ungünstige Wirkung von Aqua dest. und 0,85%-iger NaCl-Lösung auf die Mycoplasmen. Als Schutzlösung durchaus geeignet erwiesen sich Magermilch und Mixt.desicc. Alle Versuchsstämme, auch der Kontrollstamm PPLO x 95, wuchsen in Mixt.desicc. oft in zahlreicheren, aber kleinen Kolonien (bis 150 Mikra Ø), in Magermilch jedoch typischer. Die Kolonien wurden in Magermilch oft doppelt so groß wie in Mixt.desicc.; sie zeigten das typische scharf konturierte Zentrum.

Die Versuchsstämme Mü 113 und Mü 19 f wuchsen nicht zufriedenstellend. Die Agarplatten waren bereits bei einer Verdünnung von $10^4$ sehr dünn besiedelt, und die gewachsenen Kolonien zeigten eigenartige geschrumpfte und zusammengeflossene Kolonieformen, zum Teil ohne Zentrum, der Stechapfelform von Blutkörperchen ähnlich.

2. Einfluß der Einfriertemperaturen und -methoden (- 20°C und - 70°C, Langsam- bzw. Schnellmethode) auf die Überlebensrate

Der 2. Versuch diente der Feststellung der für Mycoplasmen günstigsten Einfriermethode. Als Schutzlösung wurden Magermilch und Mixtura desiccans verwendet, die sich im 1.Versuch als geeignet erwiesen hatten.

Für die beiden Schutzlösungen waren ca. 60 ml bewachsene Bouillon nötig (= 2 Erlenmeyerkölbchen). Das in 1,5 ml der jeweiligen Schutzlösung aufgenommene Zentrifugat wurde in Einfrierampullen von 1 ml Fassungsvermögen aufgeteilt. Je Schutzlösung wurden 4 Einfrierampullen benötigt (für jede Einfriertemperatur 2) und mit 0,3 ml der Mycoplasmen-Suspension beschickt.

Zur Kontrolle des Wachstums vor dem Einfrieren wurden von jeder Mycoplasmen-Aufschwemmung in den beiden Schutzlösungen die im vorstehenden beschriebenen Verdünnungen hergestellt und 0,1 ml jeder Verdünnung und des Originals auf Agarplatten gebracht und ausgespatelt. Die Platten wurden 3 Tage bebrütet und nach der beschriebenen Methode ausgezählt.

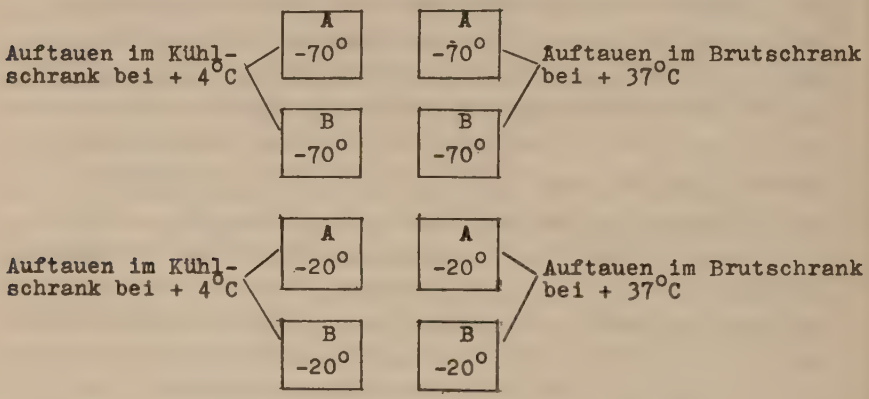
Nach Kennzeichnung der Ampullen und nach Vorkühlung für 30 Minuten bei + 4°C im Kühlschrank erfolgte das Einfrieren in einer Kältelösung aus Alkohol-Kohlensäureschnee. Dazu wurde denaturierter Aethylalkohol mit Kohlensäuretrockeneis auf - 70°C abgekühlt; der Kohlensäureschnee wurde mit Pralldüse aus der handelsüblichen Stahlflasche gewonnen. Der Inhalt der senkrecht in das Kältebad getauchten Ampullen fror in 2 - 3 Sek. zu einem kleinen Block durch. Dieses Verfahren, das "senkrechte Einfrieren", ist bei so geringen Mengen des einzufrierenden Materials vollkommen zufriedenstellend.

Nach Versuchen von H ör t e r beeinflußt das Einfrieren

im Block von 3 - 4 mm Schichtdicke die Gesamttrocknungsdauer in keiner Weise. Die restlichen 4 Ampullen wurden bei - 20°C in der Kühltruhe mit gleichmäßigem Temperaturabfall in 25 - 30 Minuten eingefroren. Bis zum Durchfrieren des Ampulleninhaltes in der Kühltruhe wurden die 4 bei - 70°C eingefrorenen Ampullen auf Kohlensäureschnee im Thermosgefäß aufbewahrt.

Nach dem Einfrieren wurde je 1 Ampulle mit schnell (- 70°C) und 1 Ampulle mit langsam (- 20°C) eingefrorenem Material beider Schutzlösungen im Brutschrank bei + 37°C bzw. im Kühlschrank bei + 4°C aufgetaut. Von jedem Ampulleninhalt wurden 3 Verdünnungen hergestellt und je 0,1 ml davon und von dem unverdünnten Inhalt auf PPLO-Agarplatten gebracht und steril ausgespatelt.

Das folgende Schema gibt die Versuchsanordnung wieder:




Schutzlösung A = Magermilch
Schutzlösung B = Mixtura desiccans

Der Ampulleninhalt war im Brutschrank nach ca. 5 Minuten, im Kühlschrank nach ca. 10 Minuten völlig aufgetaut.

Ergebnisse des zweiten Versuches:

Das Zahlenmaterial ist in der Tabelle II zusammengefaßt.

Alle Versuchsstämme, bis auf Mü 113, zeigten sich äußerst frohwüchsig und waren nur in der Verdünnung $10^5$ mit der Zählscheibe auszuzählen. Sie wuchsen unverdünnt in Rasenform. Die einzelnen Kolonien waren nur schwer erkennbar und bildeten kein Zentrum. Nur einzelne am Rand liegende Kolonien erreichten eine Größe von 50 - 100 Mikra im ∅. In den Verdünnungen $10^5$ und $10^6$ wuchsen die Kolonien in Magermilch und Mixt.desicc. in typischer Form mit deutlichen Zentren. Sie erreichten eine Größe von durchschnittlich 100 - 200 Mikra. Der Kontrollstamm PPLO x 95 zeigte ebenso wie der sehr frohwüchsige Stamm Mü 100 eine hohe Überlebensquote nach dem Einfrieren. Beide Stämme wiesen, einzeln betrachtet, in der Schutzlösung Magermilch bei langsamem wie auch schnellem Einfrieren eine Überlebensrate von 100% auf. Die durchschnittliche Absterbequote bei Magermilch lag bei den Stämmen Mü 100, Mü 97, Mü 106, Mü 19 f und PPLO x 95 zusammen nach schnellem Einfrieren bei - 70°C bei 17,1%, nach langsamem Einfrieren bei 30,4%. Die Methode des schnellen Einfrierens war also deutlich überlegen.

Beim Einfrieren des Materials in Mixtura desiccans erwies sich die Einfriertemperatur von - 20°C und damit die Methode des langsamen Einfrierens überlegen. Durchschnittliche Absterbequote bei - 20°C = 38,0%, bei - 70°C = 44,3%.

Der Stamm Mü 113 wuchs bereits in der Verdünnung $10^4$ so spärlich, daß er bei der Berechnung der durchschnittlichen Absterbequote nicht berücksichtigt werden konnte.

Bei diesem Versuch war Magermilch als Schutzlösung besser geeignet als Mixt.desicc.

Das eingefrorene Material wurde im Kühlschrank und im Brut-

Tabelle II

| Stamm | Verdg. | Zahl d. Kolonien vor d. Einfr. | | Zahl der Kolon | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Magermilch | | | |
| | | | | Auftauen im Brütschrank | | Auftauen im Kühlschrank | |
| | | Magerm. | Mst. desic | -20° | -70° | -20° | -70° |
| Mü 97 | Original<br>$10^4$<br>$10^5$<br>$10^6$ | ++++<br>>4000<br>2988<br>279 | ++++<br>>4000<br>560<br>101 | ++++<br>>4000<br>1619<br>113 | ++++<br>>4000<br>2224<br>242 | ++++<br>>4000<br>1935<br>147 | ++++<br>>4000<br>1850<br>111 |
| Mü 100 | Original<br>$10^4$<br>$10^5$<br>$10^6$ | ++++<br>>4000<br>1679<br>107 | ++++<br>>4000<br>465<br>73 | ++++<br>>4000<br>2009<br>157 | ++++<br>>4000<br>1621<br>306 | ++++<br>>4000<br>2194<br>127 | ++++<br>>4000<br>1792<br>170 |
| Mü 106 | Original<br>$10^4$<br>$10^5$<br>$10^6$ | ++++<br>>4000<br>2115<br>301 | ++++<br>>4000<br>471<br>93 | ++++<br>>4000<br>1201<br>183 | ++++<br>>4000<br>1359<br>132 | ++++<br>>4000<br>1113<br>127 | ++++<br>>4000<br>1464<br>174 |
| Mü 113 | Original<br>$10^4$<br>$10^5$<br>$10^6$ | ++++<br>192<br>17<br>4 | ++++<br>133<br>15<br>3 | ++++<br>89<br>13<br>3 | ++++<br>72<br>7<br>3 | ++++<br>36<br>17<br>5 | ++++<br>80<br>17<br>2 |
| Mü 194 | Original<br>$10^4$<br>$10^5$<br>$10^6$ | ++++<br>>4000<br>1057<br>220 | ++++<br>>4000<br>677<br>120 | ++++<br>>4000<br>543<br>62 | ++++<br>>4000<br>587<br>101 | ++++<br>>4000<br>479<br>78 | ++++<br>>4000<br>1107<br>155 |
| PPLO x95 | Original<br>$10^4$<br>$10^5$<br>$10^6$ | ++++<br>>4000<br>742<br>67 | ++++<br>>4000<br>799<br>171 | ++++<br>>4000<br>1247<br>250 | ++++<br>>4000<br>1180<br>200 | ++++<br>>4000<br>950<br>60 | ++++<br>>4000<br>1021<br>50 |

| ion n.d. Einfrieren | | | | Absterbequote n. Einfrieren in %, Verdg. 10⁵ | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mistura desiccans | | | | | | | |
| Büftaüen im Gefrierschrank | | Büftaüen im Kühlschrank | | Magermilch | | Mist. desicc. | |
| -20° | -70° | -20° | -70° | -20° | -70° | -20° | -70° |
| ++++ >3000 593 45 | ++++ >3000 391 28 | ++++ >3000 145 22 | ++++ >3000 320 29 | 55,5 | 31,8 | 42,1 | 36,6 |
| ++++ >3000 517 47 | ++++ >3000 256 31 | ++++ >3000 175 22 | ++++ >3000 244 27 | 0 | 0 | 25,5 | 46,2 |
| ++++ >3000 336 41 | ++++ >3000 218 29 | ++++ >3000 156 21 | ++++ >3000 201 19 | 45,2 | 33,2 | 48,0 | 55,6 |
| ++++ 45 10 3 | ++++ 37 7 2 | ++++ 66 11 3 | ++++ 43 9 3 | 0 | Verdg. 10⁴ 60,4 | 58,6 | 69,9 |
| ++++ >3000 321 32 | ++++ >3000 281 45 | ++++ >3000 241 21 | ++++ >3000 333 27 | 51,6 | 20,6 | 59,9 | 54,0 |
| ++++ >3000 531 40 | ++++ >3000 384 60 | ++++ >3000 717 54 | ++++ >3000 744 56 | 0 | 0 | 14,6 | 29,1 |
| Absterbequote Gesamtdurchschnitt = | | | | 30,46 | 17,12 | 38,02 | 44,3 |

schrank aufgetaut. Je 1 Ampulle jeder Einfriertemperatur und Schutzlösung wurde für 5 Minuten in den Brutschrank bzw. für 10 Minuten in den Kühlschrank bis zum völligen Auftauen der eingefrorenen Suspension gebracht. Die Ergebnisse:
Bei der Schutzlösung Magermilch wie bei Mixtura desiccans hatte das langsame Auftauen im Kühlschrank einen größeren Abfall der Keimzahl zur Folge als das Auftauen im Brutschrank. Besonders deutlich trat dies bei Mixt.desicc. bei dem bei - 20°C langsam eingefrorenen Material hervor.

3. Einfluß des Trocknungsvorganges

Es wurde jeder Mycoplasmenstamm in Magermilch und Mixt.desicc. bei - 20°C und - 70°C langsam und schnell eingefroren und anschließend getrocknet. Je Schutzlösung wurden 6 Gefrierampullen beschickt. Vor dem Einfrieren wurden von dem in den beiden Schutzlösungen suspendierten Mycoplasmenmaterial die 3 Verdünnungen hergestellt und von jeder Verdünnung und der unverdünnten Suspension 0,1 ml auf PPLO-Agarplatten ausgespatelt. Nach 3-tägiger Bebrütung erfolgte Auszählung der gewachsenen Kolonien. In jede Einfrierampulle wurde 0,3 ml Mycoplasmensuspensio gefüllt. Für die spätere Überprüfung nach 4 Monaten kennzeichneten wir die Ampullen wie folgt:

Schutzlösung A = Magermilch
Schutzlösung B = Mixtura desiccans
Einfriertemperatur -20°C bzw. - 70°C
Tag der Gefriertrocknung
Lagerungstemperatur + 4°C bzw. + 20°C

Je eine Ampulle jeder Schutzlösung und Einfriertemperatur wurde sofort nach Abschluß der Gefriertrocknung überprüft. Die Ampullen wurden zum Öffnen zirkulär angesägt. Dem getrockneten Material wurden 0,3 ml Aqua dest. zugefügt. Das Trockengut löste sich in wenigen Sekunden ohne Rückstände. Von jedem

Ampulleninhalt wurden 3 Verdünnungen hergestellt und mit 0,1 ml jeder Verdünnung und der originalen Suspension eine PPLO-Agarplatte beimpft. Nach 3-tägiger Bebrütung bei 37°C wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

Die Gefriertrocknung wurde mit der Gefriertrocknungsanlage GO 1 der Firma Leyboldt, Hochvakuumanlagen Köln-Bayenthal, durchgeführt. Das Einfrieren und Trocknen ist bei dieser Anlage in 2 verschiedenen Arbeitsgängen möglich, und somit konnten die Einfriertemperaturen nach den Erfordernissen variiert werden. Das Einfrieren erfolgte nach einer Vorkühlung von 30 Minuten bei + 4°C nach 2 Methoden:

a) nach der Schnellmethode bei - 70°C
b) nach der Langsammethode bei - 20°C

Zu a) Die Einfrierampullen wurden senkrecht in das Kältebad getaucht, das während des Einfriervorganges auf - 70°C gehalten wurde.

Zu b) Das Trockengut wurde in senkrecht stehenden Ampullen langsam (in ca. 3 0 Minuten) in der Kühltruhe bei - 20°C eingefroren.

Die Ampullen wurden bis zum Anschluß an die Vakuumpumpe im Thermosgefäß auf Kohlensäureschnee aufbewahrt.

Die Gefriertrocknungsanlage GO 1 der Firma Leyboldt besteht mit Ausnahme der Trockenräume aus Metall. Als Trockenraum diente ein Glaszylinder von 40 mm Ø und 250 mm Länge, der mit einem Schliff an den Anschlußstutzen angeschlossen wird. Dieser Glaszylinder konnte 22 - 25 Einfrierampullen von 1 ml Fassungsvermögen aufnehmen. Zur Kühlung wurde 1 Dewargefäß über den Trockenraum geschoben, das denaturierten Aethylalkohol , der mit Kohlensäureschnee auf - 35°C gebracht wurde, enthielt. Als Vorvakuumpumpe diente eine zweistufige rotierende Ölpumpe mit Gasballasteinrichtung vom Typ $D_2$ Leyboldt. Sie pumpt die Wasserdämpfe in den Abscheider hinein, wo sie

teils kondensiert teils wieder abgeführt werden. Die Meßröhre eines thermoelektrischen Vakuummeters ermöglicht die Messung des Vorvakuums. Über die Vakuumleitung steht die Vorpumpe mit einer Öldiffusionspumpe in Verbindung, die als Hochvakuumpumpe dient. Sie hat eine Saugeschwindigkeit von 100/sec. bei $10^{-3}$ Torr und wird elektrisch beheizt. Von dem Verteilerstück geht eine weitere Meßröhre zur Messung des Hochvakuums ab. Es kann ein Vakuum von 1 x $10^{-3}$ Torr erreicht werden.

Die 12 Ampullen mit dem eingefrorenen Material wurden aus dem Thermosgefäß in den Trocknungsraum, den Glaszylinder, gebracht und dieser sofort an den Anschlußstutzen des Gerätes angeschlossen. Das Ventil wurde geöffnet und die Vorpumpe eingeschaltet. Über den Rezipienten wurde das Dewargefäß mit der Kühlflüssigkeit geschoben und an der Halterung befestigt. Zur Kontrolle der Temperatur der Kühlflüssigkeit wurde ein Thermometer in das Dewargefäß gebracht und dort bis zum Ende der Haupttrocknungsphase belassen.

Die Trocknung wurde regelmäßig gegen 14.oo Uhr begonnen und war nach 20 Stunden abgeschlossen. Das Vakuummeter zeigte während 17 - 18 Stunden einen Druck von ungefähr 2 - 1 x $10^{-1}$ Torr an. Die Temperatur der Kühllösung stieg im Verlauf der Trocknung von oben nach unten an und betrug nach der ersten Trocknungsphase (nach ca.18 Stunden) - 15°C am Boden des Dewargefäßes. Somit wurde bei dieser Temperatur der eutektische Punkt noch hinreichend berücksichtigt. Nach 18 Stunden wurde das Dewargefäß entfernt und bei Zimmertemperatur weiter getrocknet (Nachtrocknung). Dabei stieg der Druck zunächst an, um dann wieder abzufallen. War der Druck tiefer als 1 x $10^{-1}$ gefallen, wurde die Öldiffusionspumpe eingeschaltet; das Trockengut enthielt dann makroskopisch kein Eis mehr. Nach ca. 2 Stunden fiel der Druck auf annähernd1 x $10^{-2}$ Torr; das bedeutete nach den Versuchen von H ö r t e r das End-

vakuum. Nach Abschluß der Trocknung wurden die Ampullen an einem besonderen Abschmelzrechen unter Vakuum abgeschmolzen. Das war durch die hohe Leistung der Pumpen innerhalb weniger Minuten möglich. Die abgeschmolzenen Ampullen wurden mit TEX VAC HF Vakuumtester am Versuchstag und nach beendeter Lagerung auf Vakuumdichtheit geprüft. Die Struktur des Trocknungsmaterials war homogen porös und weiß (bei Milch) und gelblich fädig porös (bei Serum). Danach wurden die Ampullen, je eine von jeder Schutzlösung und Einfriertemperatur, unter Vakuum bei + 4°C bzw. Zimmertemperatur 4 Monate aufbewahrt.

Zahlreiche Vorversuche dienten dem Vertrautwerden mit der Technik und der Anlage.

Ergebnisse des 3. Versuches:

Die Ergebnisse des 3. Versuches sind in der Tabelle III zusammengefaßt.

Vergleichende Versuche nach der Gefriertrocknung in den Schutzlösungen Magermilch und Mixt.desicc. zeigten, daß Magermilch bei langsamem Einfrieren als Schutzlösung überlegen war. Die Keimauszählungen v o r der Gefriertrocknung ergaben im Durchschnitt ungefähr gleiche Werte in beiden Schutzlösungen. N a c h dem Einfrieren und Trocknen zeigte sich, daß die Methode des langsamen Einfrierens in Magermilch wie auch in Mixt.desicc. bei Mycoplasmen die höheren Überlebensraten erbrachte. Die Absterberate lag bei der Schnelleinfriermethode bei - 70°C in Magermilch mit 69,91% am höchsten (bei - 20°C 30,45%); bei Mixt.desicc. lagen beide Werte dicht beieinander. (47,41% bei - 20°C, 48,88% bei - 70°C) Es war hier kein so eindeutiges Überwiegen der einen oder anderen Methode zu beobachten. Dieser 3.Versuch, Einfrieren mit anschließender Trocknung, brachte in Bezug auf Magermilch andere Ergebnisse als der 2.Versuch. Die günstigste Einfriertemperatur für Mycoplasmen in Magermilch lag bei dem vorhergehenden 2.Versuch bei - 70°C.

Tabelle III

| Stamm | Verdg. | vor d. Einfrieren | | nach dem Einfrieren u. Trocknen | | | | Absterbequote n. Einfrieren u. Trocknen in %, Verdg. $10^4$ | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Magermilch | | Mixtura desiccans | | Magermilch | | Mixt. desicc. | |
| | | Magermilch | Mixt. desicc. | -20° | -70° | -20° | -70° | -20° | -70° | -20° | -70° |
| Mü 97 | Original | +++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | 0 | 31,8 | 51,0 | 58,6 |
| | $10^4$ | 954 | 2314 | 970 | 650 | 1123 | 957 | | | | |
| | $10^5$ | 69 | 718 | 85 | 38 | 330 | 159 | | | | |
| | $10^6$ | 11 | 40 | 19 | 17 | 40 | 7 | | | | |
| Mü 100 | Original | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | 20,0 | 46,8 | 59,5 | 39,2 |
| | $10^4$ | 2340 | 2100 | 1870 | 1243 | 850 | 1275 | | | | |
| | $10^5$ | 610 | 212 | 92 | 27 | 73 | 102 | | | | |
| | $10^6$ | 56 | 25 | 47 | 16 | 3 | 8 | | | | |
| Mü 106 | Original | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | ++++ | ++++ | 11,4 | 80,1 | 88,7 | 81,7 |
| | $10^4$ | 2112 | 2751 | 1870 | 420 | 310 | 501 | | | | |
| | $10^5$ | 943 | 455 | 37 | 21 | 31 | 88 | | | | |
| | $10^6$ | 41 | 40 | 9 | - | 6 | 15 | | | | |
| Mü 11a | Original | ++ | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | 38,0 | 74,0 | 0 | 14,5 |
| | $10^4$ | 100 | 69 | 62 | 26 | 249 | 59 | | | | |
| | $10^5$ | 22 | 25 | 5 | 5 | 54 | 14 | | | | |
| | $10^6$ | 2 | 3 | - | - | 3 | - | | | | |
| Mü 19f. | Original | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | 70,2 | 92,8 | 77,8 | 80,0 |
| | $10^4$ | 84 | 170 | 25 | 6 | 31 | 28 | | | | |
| | $10^5$ | 34 | 45 | + | 3 | 3 | 7 | | | | |
| | $10^6$ | 36 | - | - | - | - | - | | | | |
| PPLO x 95 | Original | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | 43,1 | 94,0 | 7,5 | 19,3 |
| | $10^4$ | 2971 | 2851 | 1088 | 188 | 2635 | 2300 | | | | |
| | $10^5$ | 2350 | 1545 | [illegible] | [illegible] | 791 | 290 | 30,45 | 69,11 | 47,44 | 48,88 |
| | $10^6$ | [illegible] | [illegible] | [illegible] | [illegible] | [illegible] | [illegible] | | | | |

Alle 5 Versuchsstämme und der Kontrollstamm PPLO x 95 wuchsen nach Resuspendierung des getrockneten Materials spontan an. Schon nach 24 Stunden zeigten sich häufig die ersten Kolonien. Das Wachstum war in allen 3 Verdünnungen zufriedenstellend. Auch in der Verdünnung $10^6$ waren bis auf den nur spärlich wachsenden Stamm 19 f die typischen großen (150 - 200 Mikra Ø) Kolonien mit deutlichem Zentrum zu beobachten.

Relative Werte über die Verminderung der Keimzahl durch den Trocknungsprozeß ergeben sich aus der Differenz der durchschnittlichen Absterbequoten der Tabellen II und III.

4. Überlebensrate nach viermonatiger Lagerung unter Vakuum bei + 4°C und + 20°C

Nach 4 Monaten wurden die Ampullen auf die Zahl der noch vorhandenen lebenden Keime überprüft. Dazu wurden die Ampullen nach Öffnung mit 0,3 ml Aqua dest. beschickt. Das getrocknete Material löste sich sofort. Von jeder Schutzlösung, von dem bei - 20°C und dem bei - 70°C eingefrorenen Material, wurden 3 Verdünnungen hergestellt und je 0,1 ml jeder Verdünnung und des unverdünnten Ampulleninhaltes auf eine PPLO-Agarplatte gebracht und nach Bebrütung der Lebendkeimgehalt bestimmt.

Ergebnisse des 4. Versuches:

Die ermittelten Werte sind in Tabelle IV zusammengefaßt.

Alle 5 Versuchsstämme und der Kontrollstamm wuchsen nach Resuspendierung ohne Verzögerung an. Bereits nach 24 Std. zeigten sich die typischen Kolonien mit dem warzenartigen Zentrum. Es war auch hier, wie in den vorangegangenen 3 Versuchen, zu beobachten, daß die Kolonien in Mixt.desicc. auf

Tabelle IV

| Stamm | Verdg. | Zahl der Kolonien n. Einfr. u. Trocknen (Tab. III) | | | | Zahl der Kolonien n. 4 Mon. Lagerung bei +20° | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Magermilch | | Mist. dessic. | | Magermilch | | Mist. dessic | |
| | | -20° | -70° | -20° | -70° | -20° | -70° | -20° | -70° |
| Mü 97 | Original | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | $10^4$ | 970 | 650 | 1183 | 957 | 22 | - | 490 | 171 |
| | $10^5$ | 85 | 38 | 330 | 159 | 2 | - | 40 | 0 |
| | $10^6$ | 19 | 17 | 40 | 7 | - | - | 2 | - |
| Mü 100 | Original | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | ++ | +++ | +++ |
| | $10^4$ | 1870 | 1243 | 850 | 1375 | 71 | - | 104 | 159 |
| | $10^5$ | 92 | 27 | 73 | 102 | 2 | - | 7 | 3 |
| | $10^6$ | 47 | 16 | 3 | 8 | - | - | - | 1 |
| Mü 106 | Original | ++++ | +++ | ++++ | ++++ | - | 248 | +++ | +++ |
| | $10^4$ | 1820 | 420 | 310 | 501 | - | - | 209 | 658 |
| | $10^5$ | 37 | 21 | 31 | 88 | - | - | 39 | 91 |
| | $10^6$ | 9 | - | 6 | 15 | - | - | 3 | 8 |
| Mü 113 | Original | ++ | +++ | +++ | + - | +++ | +++ | ++++ | +++ |
| | $10^4$ | 62 | 26 | 249 | | 33 | 3 | 175 | 33 |
| | $10^5$ | 5 | 5 | 54 | 14 | 16 | - | 30 | 2 |
| | $10^6$ | - | - | 3 | - | - | - | 2 | - |
| Mü 19f | Original | ++ | ++ | ++ | ++ | ++++ | +++ | +++ | +++ |
| | $10^4$ | 25 | 6 | 31 | 28 | - | - | - | - |
| | $10^5$ | 4 | 3 | 3 | 7 | - | - | - | - |
| | $10^6$ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PPLO x 95 | Original | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | - | ++++ | +++ |
| | $10^4$ | 1688 | 188 | 2635 | 2300 | 63 | - | 299 | 121 |
| | $10^5$ | 333 | 21 | 791 | 290 | 6 | - | 101 | 3 |
| | $10^6$ | 66 | 16 | 152 | 53 | - | - | 8 | - |

| Kolonien n. 4 Mon. bei + 4° | | | Absterbequote in % Verdg. 10⁴ Magermilch | | | | Absterbequote in % Verdg. 10⁴ Mistura desiccans | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| -h | Mist. desicc. | | Lagerg. + 4° | | Lagerg. + 20° | | Lagerg. + 4° | | Lagerg. + 20° | |
| 0° | -20° | -70° | -20° | -70° | -20° | -70° | -20° | -70° | -20° | -70° |
| ++<br>o<br>p<br>- | ++++<br>1110<br>157<br>+ | +++<br>1463<br>245<br>11 | 85,0 | 94,4 | 97,7 | 100 | 0,62 | 0 | 56,3 | 82,2 |
| ++<br>9<br>1<br>1 | +++<br>320<br>36<br>— | +++<br>482<br>52<br>11 | 84,8 | 98,+ | 96,2 | 100 | 56,4 | 62,1 | 87,7 | 87,5 |
| +<br>8<br>· | +++<br>439<br>+6<br>7 | +++<br>849<br>120<br>8 | 70,2 | 95,7 | 100 | 100 | 0 | 0 | 32,5 | 0 |
| ++<br>5<br>+ | +++<br>624<br>295<br>— | +++<br>143<br>7<br>— | 0 | 3,84 | 46,8 | 88,+ | 0 | 0 | 29,7 | 44,0 |
| + | +++<br>263<br>—<br>— | +++<br>126<br>—<br>— | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| ++ | ++++<br>2597<br>616<br>68 | ++++<br>2271<br>401<br>20 | 77,3 | 82,9 | 96,2 | 100 | 1,44 | 1,26 | 65,8 | 90,3 |
| Absterbequote t a u r c h s c h n i t t | | | 52,88 | 62,54 | 89,48 | 98,06 | 9,75 | 10,56 | 62,0 | 67,33 |

dem festen Nährboden eine geringere Größe erreichten (150 Mikra Ø im Durchschnitt).

Die Lagerung der Ampullen unter Vakuum im Kühlschrank brachte übereinstimmend die günstigeren Ergebnisse bei Verwendung von Magermilch sowie Mixt.desicc. im Vergleich zu der Lagerung bei Zimmertemperatur. Es ergab sich eine durchschnittliche Absterbequote bei Lagerung bei Zimmertemperatur in der Schutzlösung Magermilch von 93,77% bzw. 64,66% bei Mixt.desicc. Bei Lagerung im Kühlschrank wurden durchschnittliche Absterbequoten von 57,71% bei Magermilch und 10,15% bei Mixt.desicc. festgestellt. Bei beiden Lagerungstemperaturen zeigte die Schutzlösung Mixt.desicc. günstigere Überlebensraten im Vergleich zu Magermilch. Bei weitem überlegen erwies sich Mixt. desicc. als Schutzlösung beim Gefriertrocknen von Mycoplasmen mit anschließender Lagerung im Kühlschrank. Die Überlebensrate liegt hier bei 89,85% gegenüber 42,29% bei Magermilch.

Als Einfriertemperatur erwies sich in allen Fällen - 20°C und damit die Methode des langsamen Einfrierens als besser geeignet . Damit wurden in Bezug auf die Einfriertemperatur die Ergebnisse des 3. Versuches bestätigt.

5. Stichprobenuntersuchungen auf Restfeuchtigkeit (RF) bei lyophil getrockneten Mycoplasmen

Nach 4-monatiger Lagerung unter Vakuum bei + 4°C wurde für eine Einfrierampulle von jedem Stamm die Restfeuchtigkeit bestimmt. Die Untersuchungen wurden auf eine Ampulle je Stamm begrenzt, weil die Restfeuchtigkeitsbestimmung im Bundesgesundheitsamt, Berlin, Max von Pettenkofer-Institut, durchgeführt werden mußte. Für derartige Untersuchungen standen im Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Münster die dafür notwendigen technischen Einrichtungen nicht zur

Verfügung. Es soll mit den ermittelten Werten nur ein Überblick über die nach 20-stündiger Trocknung noch vorhandene Restfeuchtigkeit gegeben werden.

Untersuchungsgang:

Das lyophil getrocknete Mycoplasmenmaterial befand sich in auf unterschiedliche Länge abgeschmolzenen Einfrierampullen. Die Ampullen wurden vor Öffnung auf vorhandenes Vakuum überprüft. Die Ampulle mit Stamm Mü 106 war ohne Vakuum; daher ergab sich eine hohe Restfeuchtigkeit von mehr als 10%. Für exakte Gewichtsbestimmungen und die Nachtrocknung wurde das Trockengut im trockenluftbeheizten Brutraum in Agglutinationsröhrchen verbracht. Vorher war das Gewicht jedes Agglutionationsröhrchens durch zweimalige Wägung und Errechnung des Mittelwertes bestimmt worden. Die Röhrchen wurden mit dem Trockengut vor und nach der Nachtrocknung gewogen. Die Differenz des Leergewichtes des Röhrchens und des Röhrchengewichtes vor der Nachtrocknung ergab das Gewicht des Trockengutes. Die Differenz der Röhrchengewichte zwischen Vor- und Nachtrocknung ergab das Gewicht des Restwassers.

Die Nachtrocknung fand 5 Tage lang im $CaCl_2$-Exsikkator bei + 37°C statt. Danach wurde der Exsikkator über $CaCl_2$-Patronen im Brutraum geflutet. Die Röhrchen wurden unmittelbar danach - bis zur Abschlußwägung - durch vorgetrocknete Korkstopfen verschlossen gehalten.

Die Reihenfolge der einzelnen Wägungen geht aus der Tabelle V hervor.

Beim Verbringen des Trockengutes in die Agglutinationsröhrchen traten gelegentlich Substanzverluste auf. Damit lassen sich vielleicht die Streuungen im Gewicht des Trokkengutes erklären.

Es ergab sich eine durchschnittliche RF von 5,5%.

Tabelle V

| Ampulle Stamm | Vakuum | Röhrchen-gewicht (g) | Gewicht (g) vor Trockng. | Gewicht (g) nach Trockng. | a)Gewicht d. Trockengutes b)Gewicht d. Restwassers (mg) | RF |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Mü 97 | + | 12,293385 | 12,33985 | 12,33727 | a)46,465 b) 2,58 | 5,5% |
| Mü 100 | + | 11,459645 | 11,48914 | 11,487125 | a)29,495 b) 2,015 | 6,8% |
| Mü 106 | - | 11,439095 | 11,487 | 11,481495 | a)47,905 b) 5,505 | 11,5% |
| Mü 113 | + | 11,03744 | 11,07065 | 11,069035 | a)33,21 b) 1,615 | 4,9% |
| Mü 19 f | + | 11,51973 | 11,540105 | 11,538445 | a)30,375 b) 1,66 | 5,5% |
| PPLO x 95 | + | 11,522 | 11,56358 | 11,56155 | a)41,58 b) 2,03 | 4,9% |
| Ø RF ca. 5% | | | | | | |

## C. Besprechung der Ergebnisse

Bei Überprüfung der 4 Schutzlösungen Aqua dest., physiologischer NaCl-Lösung, Magermilch mit 7,5% Glukose und Mixtura desiccans nach Fry zeigten sich Magermilch und Mixt.desicc. als Schutzlösung für die 6 untersuchten Stämme von Mycoplasma gallinarum als gut geeignet. Kolonienwachstum in einer Verdünnung von $10^6$ nach 6-stündiger Einwirkungszeit dokumentierte die gute Verträglichkeit dieser Schutzlösungen. Ungeeignet waren Aqua dest. und NaCl-Lösung. In beiden Lösungen war nach 3-stündiger, zum Teil schon 1 1/2-stündiger Einwirkungszeit in den gewählten Verdünnungen kein Mycoplasmenwachstum mehr festzustellen. Diese Versuchsergebnisse bestätigen die Beobachtungen von Ficker, Otten, Stamp, Fry, Hörter (4,5,13,18,6,7), daß eiweißreiche Medien wie Serum, Milch und Bouillon die Widerstandsfähigkeit der Bakterien gegen Einfrieren und Trocknen erhöhen, während wäßrige Lösungen die Überlebensrate herabsetzen. Bei den Untersuchungen von Ficker (4,5) wirkte Aqua dest. und auch physiologische NaCl-Lösung in hohem Grade bakterizid, während in Bouillon nahezu die Werte der originalen Keimzahl erhalten blieben. Ficker hält Milch, wie auch unsere Versuche ergaben, für eines der am besten geeigneten Schutzmedien. Die von uns beobachtete hochgradige Empfindlichkeit der Mycoplasmen gegen Aqua dest. und physiologische NaCl-Lösung könnte durch Änderung des osmotischen Druckes bedingt sein, die nach Ansicht Fickers die Membran der Bakterienzelle erheblich schädigen kann. Gerade bei Mycoplasmen müßte sich diese Schädigung erheblich auswirken, da sie nach Untersuchungen von Ruska und Poppe keine Zellmembran im eigentlichen Sinne sondern nur ein Plasmolemma besitzen sollen. Übereinstimmend stellten Smith und Sasaki und

B u t l e r (70,27) eine ungünstige Wirkung von Aqua dest. und physiologischer NaCl-Lösung auf Mycoplasmen fest.

Die Ergebnisse des langsamen und schnellen Einfrierens (- 20°C und - 70°C) ohne und mit anschließender Trocknung stimmten grundsätzlich mit den Versuchsergebnissen von N e u m a n n, F e l d m a n n, H ö r t e r, S c h e i b n e r (11,3,7,8,14) überein. Das langsame Einfrieren bei - 20°C war in beiden Schutzlösungen Magermilch und Mixt.desicc. der Methode des sturzartigen Einfrierens bei - 70°C überlegen. Vergleicht man beide Schutzlösungen bei einer Einfriertemperatur von - 70°C, so ergeben sich günstigere Werte bei Verwendung von Mixt.desicc. Abweichende Werte lieferte Magermilch nur beim Einfrieren ohne anschließende Trocknung; hier erbrachte das Einfrieren bei - 70°C erheblich höhere Überlebensraten.

Aus diesen Ergebnissen kann, wie schon von vielen Autoren betont, geschlossen werden, daß zur Erzielung optimaler Überlebensraten bei der Gefriertrocknung das Einfrierverfahren auf Keimart und Schutzlösung abgestimmt werden muß.

Auftauversuche des gefrorenen Materials im Brutschrank und im Kühlschrank ergaben, daß sich die Methode des schnellen Auftauens im Brutschrank weniger schädlich auf das Bakterienmaterial auswirkte. Diese Beobachtungen stimmen mit den Untersuchungen von V o s s (20) überein.

Die Überlebensraten aller 6 Versuchsstämme von Mycoplasma gallinarum wiesen nach 4-monatiger Lagerung unter Vakuum bei verschiedenen Temperaturen erhebliche Differenzen auf.

Bei einer Lagerungstemperatur von + 4°C ergaben sich durchschnittliche Überlebensraten in Magermilch von 42,29% und 89,85% bei Mixt.desicc. Nach Aufbewahrung bei Zimmertemperatur sanken die Überlebensraten in Magermilch auf 6,2% und in Mixt.desicc. auf 35,34% ab.

Mixt.desicc. als Schutzlösung erwies sich gegenüber Magermilch bei Lagerung der lyophil getrockneten Mycoplasmen sowohl bei Zimmer- als auch bei Kühlschranktemperatur überlegen. Nach den gewonnenen Untersuchungsergebnissen ist eine Lagerung unter Vakuum bei + 4°C von gefriergetrocknetem Material erheblich erfolgreicher. Interessante Beiträge zu dieser Frage lieferten S w i f t, F r y, N e u m a n n, O.S c h m i d t, S c h m i d t und Mitarbeiter, H ö r t e r (19,6,11,16,15,8). S w i f t, F r y sowie S c h m i d t und Mitarbeiter lagerten ihre gefriergetrockneten Kulturen mit gutem Erfolg unter Vakuum lichtgeschützt bei Zimmertemperatur. Sie führten jedoch keine Vergleichsuntersuchungen durch. F r y betont, daß Lagerung bei Kühlschranktemperatur unter Umständen noch bessere Resultate ergeben hätte.

Alle Versuche zeigten, daß die Methode der Gefriertrocknung bei Verwendung geeigneter Schutzmedien und Einfriertemperaturen auch für Mycoplasma gallinarum ein schonendes Konservierungsverfahren ist. Durchschnittliche Überlebensraten von 42,29% bei Magermilch,bzw. 89,85% bei Mixt.desicc. nach 4-monatiger Aufbewahrung bei + 4°C unter Vakuum, lassen vermuten, daß auch eine längere Lagerung zufriedenstellende Überlebensraten gewährleistet. C o n r a d (30) lyophilisierte Mycoplasmen aviärer Herkunft, die er von künstlichen Nährmedien gewonnen hatte und bewahrte sie 27 Monate bei + 4°C unter Vakuum auf. Er erzielte Überlebensraten von 23,8%. H ö r t e r (8) fand nach zweijähriger Lagerung von 32 gefriergetrockneten Bakterienstämmen bei + 4°C Überlebensraten von 80 - 100%. Der niedrigste Prozentsatz von überlebenden Keimen lag nach Untersuchungen von H ö r t e r bei 46%.

Die festgestellte Restfeuchtigkeit von durchschnittlich 5,5% stimmt mit den von S c h e i b n e r (14) als günstig für die Überlebensrate von Brucellen ermittelten Restfeuchtigkeitswerten überein.

## D. Z u s a m m e n f a s s u n g

An 6 Mycoplasmenstämmen, davon einem Kontrollstamm, wurde die Einwirkung von 4 verschiedenen Schutzmedien, verschiedenen Einfriertemperaturen - ohne und mit anschließender Trocknung - und verschiedenen Lagerungsbedingungen geprüft. Es sollte auf Grund der ermittelten Überlebensraten die günstigste Schutzlösung sowie die am besten geeignete Einfrier- und Lagerungstemperatur bestimmt werden. Die Ergebnisse lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

1. Bei Versuchen mit 4 Schutzlösungen: Aqua dest., 0,85%-iger NaCl-Lösung, Magermilch + 7,5% Glukose und Mixt.desicc. nach F r y in 4 Einwirkungszeiten: 0 Std., 1 1/2 Std., 3 und 6 Std., erwiesen sich Magermilch und Mixt.desicc. als Schutzlösung gut geeignet. Es wurde in einer Verdünnung von $10^6$ nach 6 Std. Einwirkungszeit beider Schutzlösungen Wachstum typischer Kolonien von Mycoplasma gallinarum beobachtet. Bei Einwirkung von Aqua dest. sowie physiologischer NaCl-Lösung war bereits nach 1 1/2 Std. das Wachstum in allen Verdünnungen auffallend verringert und nach 3 Stunden Einwirkungszeit war kein Wachstum mehr festzustellen.

2. Die Verwendung von 2 verschiedenen Einfriertemperaturen - 20°C (langsames Einfrieren in 30 Minuten) und - 70°C (sturzartiges Einfrieren in ca. 2 - 3 Sekunden) erbrachte in den Schutzlösungen Magermilch und Mixt.

desicc. unterschiedliche Ergebnisse. In Magermilch war eine erheblich höhere Überlebensrate beim schnellen Einfrieren bei - 70°C festzustellen. Bei Verwendung von Mixt.desicc. als Schutzlösung eignete sich die Einfriertemperatur von - 20°C besser.

3. Die Untersuchung über die Überlebensrate nach Einfrieren bei - 20°C bzw. - 70°C mit anschließender 18- 20-stündiger Trocknung brachte in einem Punkt andere Ergebnisse als unter 2. beschrieben. Mit der Methode des langsamen Einfrierens bei - 20°C ließen sich in b e i d e n Schutzlösungen, in Magermilch wie Mixt.desicc., die höheren Überlebensraten erzielen. Beim Einfrieren bei - 70°C war jedoch Mixt.desicc. als Schutzlösung überlegen.

4. Alle 5 Versuchsstämme und der Kontrollstamm wuchsen nach 4-monatiger Lagerung unter Vakuum bei Zimmertemperatur (ca. + 20°C) und Kühlschranktemperatur von 4°C ohne Verzögerung an. Die Lagerung bei + 4°C erwies sich bei Magermilch wie auch bei Mixt.desicc. am günstigsten. Es ergab sich eine Überlebensrate von 42,29% bei Magermilch und 89,85% bei Mixt.desicc. Die Lagerung der Kulturen bei Zimmertemperatur zeigte Überlebensraten von 6,2% bei Magermilch und 35,34% bei Mixt.desicc. Bei beiden Lagerungstemperaturen ergab die Verwendung der Schutzlösung Mixt. desicc. höhere Überlebensraten als Magermilch.

5. Übereinstimmend wurde für alle Stämme in allen Versuchen beobachtet, daß die in Mixt.desicc. suspendierten Mycoplasmen im Durchschnitt um die Hälfte kleinere Kolonien (bis 150 Mikra Ø) auf dem PPLO-Nährboden bildeten, als die in Magermilch suspendierten. Vielleicht ist hierfür die Verwendung von Rinderserum in der Schutzlösung nach

F r y verantwortlich zu machen. Ein Zusatz von Rinderserum zum PPLO-Agar hatte immer ein weniger ausgeprägtes Wachstum typischer Kolonien zur Folge.

6. Stichprobenuntersuchungen auf Restfeuchtigkeit ergaben eine durchschnittliche RF von 5,5%.

# Literaturverzeichnis

## Die Gefriertrocknung


Brown, J.H.: The preservation of bacteria in vacuo.II. J.Bact. 23, 44 (1932)

Elser, W.J., Thomas, A.R., Steffen, I.G.: The desiccation of sera and other biological products (including microorganisms) in the frozen state with the preservation of the original qualities of products so treated. J. Immunol, 28, 433 (1935)

Feldmann, S.: Die biologischen Eigenschaften von Bakterien nach Trocknung und Gefriertrocknung. Zbl. Bakt. I Orig. 176, 572 (1959)

Ficker, M.: Über Lebensdauer und Absterben von pathogenen Keimen. Zschr. Hyg. 29, 1 (1898)

Ficker, M.: Über die Resistenz von Bakterien gegenüber dem Trocknen. Zschr. Hyg. 59, 367 (1908)

Fry, R.M. und Greaves, R.J.: The survival of bacteria before and after drying. J. Hyg. 49, 220 (1951)

Hörter, R.: Überlebensraten von Bakterien nach der Hochvakuumgefriertrocknung. Zbl.Bakt. I Orig. 171, 526 (1958)

Hörter, R.: Überlebensraten von gefriergetrockneten Bakterien nach 2-jähriger Lagerung. Zbl. Bakt. I Orig. 178, 364 (1960)

Hammer, B.W.: A note on the vacuum desiccation of bacteria J. Med.Res. 24, 527 (1911)

10) Heim, L.: Die Widerstandsfähigkeit verschiedener Bakterienarten gegen Trocknun und die Aufbewahrung bakterienhaltigen Materials insbesondere beim Seuchendienst und für gerichtlich-medicinische Zwecke.
Zschr. Hyg. 50, 123 (1905)

11) Neumann, K.: Grundriß der Gefriertrocknung
2.Aufl.
Musterschmidt wissenschaftl. Verlag Göttingen, Frankfurt, Berlin 1955

12) Oelfken, H.: Untersuchungen über die Erhaltung der Virulenz einiger Bakterienarten durch die Vakuumgefriertrocknung.
Vet.med. Diss. Gießen (1955)

13) Otten, L.: Die Trockenkonservierung von pathogenen Keimen.
Zbl. Bakt. I Orig. 116, 199 (1930)

14) Scheibner, E.: Einfluß von Trocknungsmethode und Restfeuchtigkeit auf die Überlebensrate und die Lagerungsstabilität getrockneter Brucella Abortus- und Salmonella Abortus Ovis-Kulturen.
Vet.med. Diss. Berlin F.U. (1961)

15) Schmidt, B., Feldmann, S. und Dobberstein, H.: Untersuchungen zur Frage der Änderung der biologischen Eigenschaften von Bakterien nach Trocknung und Gefriertrocknung.
Zbl. Bakt. I Orig. 172, 573 (1958)

16) Schmidt, O.C.: Einfluß des Stabilisators, der Lagerungstemperatur undder Restfeuchtigkeit auf die Überlebensrate verschiedener Bakterien nach Lyophilisation.
Vet.med. Diss., Berlin F.U. (1957)

17) Shackell, L.P.: zit.n.Elser (2) An improved method of desiccation with some applications to biological problems.
Amer. J. Physiol. 24, 325 (1909)

18) Stamp, L.: The preservation of bacteria by drying. J.Gen.Microbiol. 1, 251 (1947)

19) Swift, H.F.: The preservation of stock cultures of bacteria by freezing and drying. J. Exper. Med. 33, 69 (1921)

20) Voss, H.: Die moderne Entwicklung der Gefriertrocknung. Bundesgesundheitsblatt Orig. 12, 177 (1960)

21) Zipplies, G. und Jendruch, H.: Versuche zur Konservierung von Rotlaufimpfkulturen mit Hilfe der Gefriertrocknung. Mhefte Vet.-med. 13, 385 (1958)

B. Pleuropneumonie - ähnliche Organismen - PPLO -

22) Adler, H.E.: Isolation of a pleuropneumonia-like organism from the air sac of a parakeet. J.Amer.Vet.Med.Ass. 130, 408 (1957)

23) Adler, H.E., D.Mc.Martin, M. Shifrine: Immunisation against mycoplasma infections of Poultry. Amer.J.Vet.Res. 82, 482-485 (1960)

24) Adler, H.E. and Yamamoto, R.: Pathogenic and nonpathogenic pleuropneumonia - like organisms in infectious sinusitis of turkeys. Amer.J. Vet.Res., 18, 655 (1957)

25) Albertsen, B.E.: Pleuropneumonia-like organisms in the serum of danish artificial insemination bulls. Nord. Vet.med. 7, 169-201 (1955)

26) Berchtold, M. und Bögel, K. Reversible Azoospermie bei Bullen und pleuropneumonieähnliche Organismen ( PPLO) Schweiz. Arch. Tierhk. 104, 76 (1962)

27) Butler, M., und Knight, C.J.G.: The survival of washed suspensions of mycoplasma. J.Gen.Microbiol. 22, 470-477 (1960) aus Vet.Bull. 30, 3541 (1960)

28) Chu, H.P.: Pleuropneumonia-like organisms of poultry and respiratory disease of poultry
Vet. Rec. 70, 55 (1958)

29) Chu, H.P.: Differential diagnosis and control of respiratory disease of poultry.
Vet. Rec. 70, 10-64-79 (1958)

30) Conrad, R.D.: Lyophilization of avian pleuropneumonia-like-organisms.
Avian Diseases 2, 132-138 (1958)

31) Cordy, D.R., Adler, H.E. and Yamamoto, R.: A pathogenic pleuropneumonia-like-organism from goats.
Cornell.Vet. 45, 50 (1955)

32) Christodoulou, Th. et Talartzis La pleuropneumonie contagieuse de la Chévre en Grece.
Office International Des Epizooties
Rapport á la XXV Session (1957)
R.No. 456

33) Dienes, L.: Morphologie und Natur der PPLO-Gruppe
J.Bact. 50, 441-459 (1945)

34) Edward, D.G.: A selective medium for pleuropneumonia-like organisms.
J.Gen.Microbiol. 1, 228 (1947)

35) Edward, D.G.: A difference in growth requirements between bacteria in the L-Phase and organisms of the pleuropneumonia group.
J.Gen.Microbiol. 8, 256 (1953)

36) Edward, D.G. and Fitzgerald, W.A.: Cholesterol in the growth of organisms of the pleuropneumonia group.
J.Gen.Microbiol. 5, 576 (1951)

37) Edward, D.G. and Fitzgerald, W.A.: The isolation of organisms of the pleuropneumonia group of dogs.
J.Gen.Microbiol. 5, 566 (1951)

38) Edward, D.G. and Freundt, E.A.: The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group.
J.Gen.Microbiol. 14, 197 (1956)

39) Edward, D.G., Hancoock, J.L. and Hignett, S.L.: Isolation of Pleuropneumonia-like-Organisms from the Bovine Genital Tract.
Vet.Rec. 59, 329 (1947)

0) Fahey, J.E.: Infectious sinusitis of turkeys caused by resistant pleuropneumonia-like organisms. Vet.Med. 52, 305 (1957)

1) Freundt, E.A.: The occurence of Mikromyces (Pleuropneumonia-like Organisms) in the female genito-urinary tract. Zbl.Bakt. II Ref. 154, 478 (1954)

2) Freundt, E.A.: The classification of the pleuropneumonia group of organisms (Borrelomycetales) Inter.Bull.Bact.Nomencl.Taxon 15, 67 (1955)

3) Fritzsche, K.: Die chronische Atemkrankheit beim Küken. Dtsch.tierärztl.Wsch. 60, 509 (1953)

4) Frosch, P.: Die Morphologie des Lungenseuchenerregers. Arch.wiss.prakt.Tierhk. 49, 35 (1923)

5) Geissler, H.: Die Mycoplasmose des Geflügels. Berliner-Münchener tierärztl.Wschr. 73, 142 (1960)

6) Grünholz, G.: Pleuropneumonieartige Mikroorganismen bei "Viruspneumonien". Klin.Wschr. 28, 480 (1950)

7) Gürtürk, S.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Morphologie des infektiösen Pneumonie-Erregers der Ziegen. Dtsch.tierärztl.Wschr. 70, 447 (1957)

8) Hartwigk, H.: Nachweis von pleuropneumonieähnlichen Organismen bei Geflügel. Berliner-Münchener tierärztl.Wschr. 71, 45 (1958)

9) Hartwigk, H.: Die chronische Atemkrankheit der Hühner. Mhefte Tierhk. 11, 1, 20-30 (1959)

0) Hennig, J.: Nachweis von PPLO bei Hühnern mit und ohne Erscheinung der CRD. Vet.med.Diss. Berlin, F.U. (1958)

51) Iterson, van W. und Ruys, A.C.: The fine structure of the mycoplasmataceae (microorganisms of the pleuropneumonia group = PPLO) 1.Mycoplasma hominis, M.fermentans and M.salivarium. J. Ultrastructure Research 3, 282 (1960)

52) Johnson, E.P. and Domermuth, G.H.: Some factors in the etiologie and control of so - called avian air sac disease. Cornell Vet. 46, 409 (1956)

53) Jungherr, E.L.: Pleuropneumonia-like organisms in poultry. Arch.exper.Vet.Med. 9, 212 (1955)

54) Kandler, G. und Kandler, O.: Ernährungs- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an PPLO und der L-Phase der Bakterien. Zbl.Bakt. II Ref. 157, 498 (1955)

55) Kandler, G. und Kandler, O.: Untersuchungen über die Morphologie und die Vermehrung der PPLO und der L-Phase der Bakterien. I.Lichtmikroskopische Untersuchungen. Arch.Mikrobiol. 21, 178-201 (1955)

56) Kandler, G. und Kandler, O.: Untersuchungen über die Morphologie und die Vermehrung der PPLO und der L-Phase der Bakterien. II. Elektronenmikroskopische Untersuchungen. Arch.Mikrobiol. 21, 202-216 (1955)

57) Keller, H.: Über die Isolierung von pleuropneumonieähnlichen Erregern bei Hühnern Schweiz.Arch.Tierhk. 100, 45 (1958)

58) Klieneberger-Nobel, E.: Microorganisms of the pleuropneumonia group. Excerpta Med. IV, 8, 80 (1955)

59) Klieneberger-Nobel, E.: Über die Wesenverschiedenheit der peripneumonieähnlichen Organismen und der L-Phase der Bakterien. Zbl.Bakt. I Orig. 165, 329-343 (195

60) Köhler, H.: Chronische Atmungskrankheit und infektiöse Bronchitis des Geflügels (Ätiologie, Erkennung und Bekämpfun Dtsch.tierärztl.Wschr. 66, 511-515 u. 568-673 (1959)

1) Köhler, W.: Die pleuropneumonieähnlichen Mikroorganismen ("pleuropneumonie-like-organisms") Mikromycetaceae, Sammelreferat
Zbl.Bakt. I Ref. 175, 103 (1960)

2) Lecce, J.G. and Sperling, F.G.: Chronic respiratory disease. III. The effect of treatment on the pleuropneumonia like organism flora of avian tracheas.
J.Amer.Vet.Med.Ass. 127, 54 (1955)

3) Monreal, G.: Ein Beitrag zur Mycoplasmose junger Küken.
Berliner Münchener tierärztl.Wschr. 10, 192-194 (1961)

4) Morton, H.E., Smith, P.F. and Keller, R.: Prevalence of pleuropneumonia-like organisms and evaluation of media and methode for their isolation from clinical material.
Amer.J.Publ.Health 42, 913 (1952)

5) von Prittwitz und Gafferon: Fehlerquellen bei der Begutachtung von Kulturen und mikroskopischen Präparaten pleuropneumonieähnlicher Organismen.
Naturwiss. 42, 113 (1955)

6) Röckl, H. und Nasemann, Th.: Die pleuropneumonieähnlichen Organismen (PPLO) und ihre Bedeutung für die unspezifische Urethritis.
Zbl.Bakt. I Orig. 165, 313 (1956)

7) Sabin, A.G.: The filterable microorganism or the Pleuropneumonia group.
Bact.Rev. 5, 1-67 (1941)

8) Shepard, M.C.: Visualization and morphology of pleuropneumonia like organisms in clinical material.
J.Bact. 73, 162 (1957)

9) Smibert, R.M., De Volt, H.M. and Faber, J.E.: A study of bacterial flora of the respiratory system of normal chickens.
Poultry Scie. 37, 159 (1958)

10) Smith, P.F. and Sasaki, S.: Stability of Pleuropneumonia-like Organisms to some physical.factors.
Dept.of Microbiol.,Sch.of Med.Univ. of Pennsylvania, Philadelphia.Pa.
Appl.Microbiol. 1958 6/3 (184-189)

71) Warren, J.: Observations of some biological characteristics of organisms of the pleuropneumonia group. J.Bact. 43, 211 (1942)

72) Yamamoto, R. and Adler, H.E.: The effect of certain antibiotics and chemical agents on PPLO of avian origin. Amer.J.Vet. Res. 17, 538 (1956)

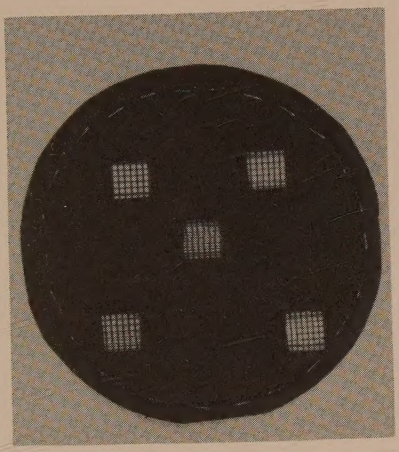
73) Yamamoto, R. and Adler, H.E.: Characterization of PPLO of avian origin. 1. Antigenic analysis of seven strains and their comparative pathogenity for birds. J.Infect.Dis. 102, 143 (1958)

74) Yamamoto, R., Adler, H.E. and Cordy, D.R.: The propagation of a virulent goat pleuropneumonia-like organism in the chick embryo. J.Bact. 69, 472 (1955)

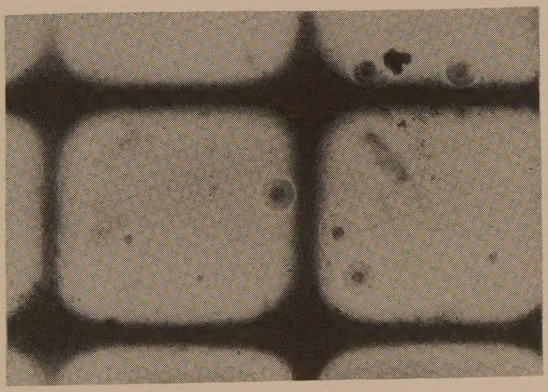
Für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und den mir zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz sowie für die gewährte Unterstützung möchte ich Herrn Oberregierungsveterinärrat Dr.Köser, Direktor des Staatlichen Veterinäruntersuchungsamtes Münster i.Westfalen, herzlich danken. Mein Dank gilt ebenso dem Direktor des Instituts für Veterinär-Hygiene der Freien Universität Berlin, Herrn Prof.Dr.Hartwigk, für die zahlreichen Hinweise und Anregungen bei der Ausarbeitung meiner Dissertation. Weiterhin danke ich Herrn Regierungsveterinär-Assessor Dr.Hörter für seine wertvolle Unterstützung. Für die mir gewährte Hilfe bei der Durchführung von Restfeuchtigkeitsbestimmungen am Bundesgesundheitsamt Berlin, Max von Pettenkofer-Institut, bin ich Herrn Prof.Dr.Ulbrich und Herrn Dr.Scheibner zu großem Dank verpflichtet.

## V. Lebenslauf

Am 31.Dezember 1932 wurde ich, Inge Brigitte Ursula Flir geb.Polzin, als Tochter des Statistikers Leo Polzin und seiner Ehefrau Margarete geb.Sierozynski in Berlin-Wilmersdorf geboren. Von 1939 - 1943 besuchte ich die 5.Volksschule in Berlin-Weißensee, von 1945 - 1952 die II.Oberschule in Berlin-Weißensee und legte dort im Juni 1952 die Reifeprüfung ab. Im September 1952 wurde ich an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin immatrikuliert. Hier bestand ich im Mai 1954 die tierärztliche Vorprüfung und im Februar 1958 die tierärztliche Prüfung. Meine Praktikantenzeit absolvierte ich am VEB Großberliner Vieh- und Schlachthöfe in Berlin O 34. Am 15.August 1958 wurde mir die Approbation als Tierärztin erteilt. Von August 1958 bis Juli 1959 war ich als Fleischbeschautierärztin am VEB Großberliner Vieh- und Schlachthöfe tätig. Am 13.2.1959 heiratete ich den Tierarzt Dr.Konrad Flir aus Berlin-Charlottenburg und übersiedelte im gleichen Jahr nach Münster in Westfalen, wo mein Mann am Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt tätig ist. Zur Zeit bin ich als Aushilfstierärztin in der Fleischbeschau am Städtischen Schlachthof Gelsenkirchen und als Vertragstierärztin beim Tiergesundheitsamt Münster im Geflügelgesundheitsdienst beschäftigt.



Zählscheibe nach Hörter



Mü 97 mit Zählscheibe
Wachstum auf PPLO - Agarplatte
Lupenvergrößerung 3,5:1,Okular 6xB/Leitz